

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-017187

(43)Date of publication of application : 23.01.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C12N 5/10
 //(C12N 5/10
 C12R 1:91)

(21)Application number : 2000-101615

(71)Applicant : BARTENSCHLAGER RALF

(22)Date of filing : 03.04.2000

(72)Inventor : BARTENSCHLAGER RALF

(30)Priority

Priority number : 99 19915178 Priority date : 03.04.1999 Priority country : DE

(54) HEPATITIS C VIRUS CELL CULTURE SYSTEM, HEPATITIS C VIRUS- RNA-CONSTRUCT, USE OF CELL CULTURE SYSTEM OR CONSTRUCT, OBTAINING OF MUTANT SUITABLE FOR CELL CULTURE OF HEPATITIS C VIRUS-RNA-CONSTRUCT, PRODUCTION OF MUTANT OF HEPATITIS C VIRUS-FULL LENGTH GENOME, HEPATITIS C VIRUS-PARTIAL GENOME OR OPTIONAL HEPATITIS C VIRUS-CONSTRUCT, HEPATITIS C VIRUS-CONSTRUCT SUITABLE FOR CELL CULTURE, ITS MUTANT, MUTANT OF HEPATITIS C VIRUS-FULL LENGTH GENOME, HEPATITIS C VIRUS PARTICLE OR VIRUSLIKE PARTICLE AND CELL INFECTED WITH THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new cell culture system mainly comprising a eucaryotic cell such as a human hepatic cancerous cell containing a genetic material comprising a specified hepatitis C virus (HCV)-specific gene and a marker gene transduced therinto and capable of detecting an HCV-RNA and an HCV-antigen according to a simple method.

SOLUTION: This new HCV cell culture system comprises a eucaryotic cell which is a human hepatic cancerous cell and is an HCV-RNA construct comprising transduced HCV- specific RNA-fragments 5'NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B and 3'NTR having a nucleotide sequence described in the formula or the like and an additionally selective marker gene (selective gene) in the HCV cell culture system mainly comprising the eucaryotic cell containing a genetic material comprising a transduced HCV-specific genetic material. The cell culture system is capable of detecting an HCV-RNA or an HCV-antigen according to a simple method and is useful for the production and/or evaluations and/or tests, etc., of a therapeutic agent and/or a diagnostic agent for treating the HCV-infection.

AGGCGAGCTAAACACCTCAGGCCAATAGGCGCATCCGTTTCTTTTAA
 GCCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTAAAGAGAGAGATCTACTCTTTTAA
 AGACCTGAGAT

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-17187
(P2001-17187A)

(43) 公開日 平成13年1月23日 (2001.1.23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
5/10		5/00	B 4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 5/10			
C 1 2 R 1:91)			

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願2000-101615(P2000-101615)	(71) 出願人	500155615 ラルフ パルテンシュラーガー ドイツ連邦共和国 ガウーオーデルンハイ ム ナッハ デム アルテン シュロス 22
(22) 出願日	平成12年4月3日 (2000.4.3)	(72) 発明者	ラルフ パルテンシュラーガー ドイツ連邦共和国 ガウーオーデルンハイ ム ナッハ デム アルテン シュロス 22
(31) 優先権主張番号	1 9 9 1 5 1 7 8. 4	(74) 代理人	100061815 弁理士 矢野 敏雄 (外4名)
(32) 優先日	平成11年4月3日 (1999.4.3)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (D E)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルス細胞培養系、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物、細胞培養系または構築物の使用、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得する方法、C

(57) 【要約】

【課題】 HCV-RNA又はHCV-抗原を直接、信頼できるかつ実験室で通常の簡単な方法で検出できる細胞培養系を提供する。

【解決手段】 HCV特異的RNA断片である5' NT R、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5Bおよび3' NTRならびに付加的に少なくとも1つの選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）を有するHCV-RNA-構築物を感染させたヒト肝細胞からなるC型肝炎ウイルス（HCV）細胞培養系を使用する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 導入されたHCV-特異的遺伝子材料を含有する、主に真核細胞を包含するC型肝炎ウイルス(HCV)細胞培養系において、真核細胞がヒト肝癌細胞であり、かつ導入されたHCV-特異的遺伝子材料がHCV-特異的RNA-断片5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B及び3' NTRおよび付加的に選択可能なマーカー遺伝子(選択遺伝子)を包含するHCV-RNA-構築物であることを特徴とするC型肝炎ウイルス(HCV)細胞培養系。

10 【外1】

【請求項2】 HCV-特異的RNA-断片5' NT *

(a) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTTT TTTT
GCTTTTTTTTTTCTTTTTTTT T GAGAGAGAGAGTCTCACTCTGTTGCC
AGACTGGAGT

(b) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTCT TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACCTCTGT
TGCCAGACT GGAGC

(c) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTAATCTTT TTTTTTTTCT TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACCTCTGT
TGCCAGACT GCAGC

(d) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTCT TTTTTTTT T GAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT

(e) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTCT TTTTTTTT T GAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT

(f) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTCT TTTTTTTT T GAGAGAGAG AGTCTCACT
CTGTTGCCA GACTGGAGT

(g) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTCT TTTTTTTT T GAGAGAGAG AGTCTCACTC
GTCTCACTCT GTTGCCAG ACTGGAGT

(h) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTTAAT CTTTTTTTCT TTTTTTTT T TTTGAGAGAG
GAGAGTCTCA CTCTGTTGCC CAGACTGGAG T

(i) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTT TTT
TTTTTTAAT CTTTTTTTCT TTTTTTTT T TTTGAGAGAG
AGAGAGTCTC ACTCTGTTGC CCAGACTGGA GT

の群から選択されるヌクレオチド配列を有する請求項2記載のHCV-RNA-構築物。

【請求項5】 HCV-RNA-構築物が請求項2から4までの少なくともいずれか1項記載の構築物である請求項1記載の細胞培養系。

【請求項6】 HCV-RNA-構築物を含有する細胞がドイツ微生物保存機関(DSMZ:ブラウンシュバイク、BRD在)に寄託番号DSM ACC 2394(研究所記号HuB1 9-13)として寄託されている請求項1記載の細胞培養系。

【請求項7】 特にHCV-感染の治療のための治療剤

* R, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B及び3' NTRおよび付加的に選択可能なマーカー遺伝子(選択遺伝子)を包含することを特徴とするHCV-RNA-構築物。

【請求項3】 配列表の配列番号1から配列番号11までのいずれか1つに記載されたヌクレオチド配列を包含する請求項2記載のHCV-RNA-構築物。

【請求項4】 3' NTRが以下に記載するヌクレオチド配列(a)~(i):

10 【外1】

および/または診断剤の製造および/または評価および/またはテストのための、請求項1または請求項5から6までのいずれか1項記載の細胞培養系および/または請求項2から4までのいずれか1項記載のHCV-RNA-構築物の使用。

【請求項8】 HCV-感染に対するワクチンの製造のための、請求項1または請求項5から6までのいずれか1項記載の細胞培養系および/または請求項2から4までのいずれか1項記載のHCV-RNA-構築物の使用。

【請求項9】 遺伝子治療のための肝細胞特異的輸送体

の製造のための、請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物の使用。

【請求項 10】 組み込まれた外来遺伝子を有し、この外来遺伝子の発現に好適である標的細胞中にこの外来遺伝子を導入するために好適である、請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物。

【請求項 11】 請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体であって、HCV-RNA-構築物に比べて高められた複製効率を有する突然変異体、を獲得する方法において、導入された HCV-特異的遺伝子材料が請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の選択遺伝子を有する HCV-RNA-構築物である請求項 1 記載の細胞培養系を、選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンから HCV-RNA-構築物またはその部分を単離することを特徴とする、前記 HCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得する方法。

【請求項 12】 単離された HCV-RNA-構築物を新たに少なくとも 1 回継代し、すなわち単離された HCV-RNA-構築物を請求項 1 記載の細胞培養系の細胞に導入し、導入された HCV-特異的遺伝子材料が選択遺伝子を有する単離された HCV-RNA-構築物である請求項 1 に記載のその際得られた細胞培養系を選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンから HCV-RNA-構築物を単離する、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】 オリジナルの HCV-全長ゲノム又は HCV-部分ゲノム又は HCV-RNA-構築物と比較して高められた複製効率を有する HCV-全長ゲノム又は HCV-部分ゲノム又は任意の HCV-構築物の突然変異体を製造する方法において、請求項 11 または請求項 12 に記載の方法を用いて HCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を製造し、これを単離し、これらの突然変異体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を決定し、オリジナルの HCV-RNA-構築物のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列と比較して、核酸突然変異およびアミノ酸突然変異の種類、数、及び位置を決定し、かつこの突然変異を意図的な突然変異誘発により、または該当する突然変異を有する配列断片の置換により、(単離された) HCV-全長ゲノムまたは HCV-部分ゲノムまたは任意の HCV-RNA-構築物中へ導入する、ことを特徴とする、前記突然変異体の製法。

【請求項 14】 高められた複製効率を有する細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物において、ヌクレオチド突然変異及び／又はアミノ酸突然変異により請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物から誘導可能であり、かつ請求項 11 から 13 までのいずれか 1 項記載の方法により得ることができること

を特徴とする、高められた複製効率を有する細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物。

【請求項 15】 次に記載するアミノ酸置換、すなわち：1283 arg → gly および／または 1383 glu → ala および／または 1577 lys → arg および／または 1609 lys → glu および／または 1936 pro → ser および／または 2163 glu → gly および／または 2330 lys → glu および／または 2442 ile → val を 1 個またはそれ以上有する、請求項 14 記載の細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物。

【請求項 16】 表 3 に記載されたヌクレオチド置換および／またはアミノ酸置換の 1 つまたはそれ以上を有し、この際表 3 は該請求項に包含される、請求項 14 または 15 記載の細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物。

【請求項 17】 オリジナルの HCV-RNA-構築物またはオリジナルの HCV-全長ゲノムと比較して高められた複製効率を有する HCV-RNA-構築物または HCV-全長ゲノムの細胞培養に適合した突然変異体において、請求項 13 記載の細胞培養に適合した HCV-RNA-構築物中で配列分析および配列比較により、これらの突然変異の種類および数を決定し、かつこれらの突然変異を意図的な突然変異誘発により、または該当する突然変異を有する配列断片の置換により、HCV-RNA-構築物中に、特に請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項記載の HCV-RNA-構築物中に、または(単離された) HCV-RNA-全長ゲノム中に導入することを特徴とする、HCV-RNA-構築物または HCV-全長ゲノムの細胞培養に適合した突然変異体。

【請求項 18】 請求項 11 から 13 までのいずれか 1 項記載の方法で得られることを特徴とする、C 型肝炎ウイルス粒子またはウイルス様粒子。

【請求項 19】 請求項 18 記載の C 型肝炎ウイルス粒子またはウイルス様粒子に感染した細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、導入された HCV-特異的遺伝子材料を含有する、つまり HCV-特異的遺伝子材料がトランスフェクションされている主に真核細胞を包含する C 型肝炎ウイルス (HCV) 細胞培養系に関する。

【0002】

【従来の技術】 C 型肝炎ウイルス (HCV) は世界的規模での慢性及び急性の肝疾患の主要原因である。たいていの HCV 感染は認識できる臨床的症状なしで進行し、感染者の 80～90% が持続的なウイルスキャリアとなり、この持続的ウイルスキャリアの 50% が多様な症状の慢性肝炎になる。この慢性感染者の約 20% が 1

0～20年の経過において肝硬変に進行し、その結果第1次肝細胞ガンが生じることがある。この慢性のC型肝炎は今日では肝臓移植が主な感染原因である。原因療法はまだ存在しない。現在提供可能な若干の治療法はインターフェロナーアルファの又はインターフェロナーアルファとプリンヌクレオシド類似体のリバビリンとからの組み合わせの高い用量での投与である。全治療者の約60%がこの治療法に効果を示すだけであり、その際に、全ての事例の半分以上が治療の中止後に新たなウイルス血症に至る。

【0003】工業国においても、罹患率が高く、慢性感染の深刻な結果及び原因療法がないために、HCV-特異的薬療法の発展が製薬学の研究及び開発の重大な目標である。この際の主要な問題は、今まで、真核細胞中でのウイルス複製及び発病の研究を可能にする適当な細胞培養系がなかったことである。

【0004】血中及び組織中でのわずかなウイルス量のため、適当な細胞培養系又は動物モデル（今日までチンパンジーが唯一可能な試験動物である）がないため、並びにウイルス様の粒子を製造する有効な系もないため、HCV-粒子の分子組成は今日まで詳細には研究もしくは解明されていない。現在存在する結果は次のようにまとめることができる：HCVは、50～60nmの粒子直径及び1.03～1.1g/mlの平均密度を有する外被を有するプラス鎖のRNAウイルスである。これは最初に1989年に分子的にクローニングされ、特性決定された（Choo et al., 1989: Science, 244, 359-362）。このHCV-RNAは約9.6kb (=9600ヌクレオチド)の長さ及び正の極性を有し、約3010個のアミノ酸の線状ポリタンパク質をコードする唯一のオープンリーディングフレーム（ORF = open reading frame）を有する（Rice 1996, in Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1996), vol. 1, pp. 931-960; Clarke 1997, J. Gen. Virol. 78, 2397; and Bartenschlager 1997, Intervirology 40, 378 and Fig. 1 A参照）。ウイルス複製においてこのポリタンパク質は細胞の及びウイルスのプロテアーゼによって成熟した、機能的に活性のタンパク質の形に分解される。

【0005】ポリタンパク質の中で、タンパク質は次のように配列されている（アミノ末端からカルボキシ末端へ）：Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B。このコアタンパク質（Core-Protein）はヌクレオキャプシドの主成分である。糖タンパク質E1及びE2は膜貫通タンパク質であり、ウイルス外被の主成分である。このタンパク質は宿主細胞へのウイルスの付着の際におそらく重要な役割があると考えられる。この3種のタンパク質のコア、E1及びE2はウイルス粒子を構築し、従って構造タンパク質として表される。タンパク質p7の機能は未だに明ら

かではない。タンパク質NS2はおそらくNS2-3プロテアーゼの接触ドメインであり、これはタンパク質NS2とNS3との間のプロセシング（Prozessierung）に関与している。タンパク質NS3は2つの機能を有しており、つまり、アミノ末端のドメインにおいてポリタンパク質プロセシングに不可欠のプロテアーゼ活性を有し、かつカルボキシ末端のドメインにおいてはおそらくウイルスRNAの複製の際に重要な役割があると考えられるNTPase/ヘリカーゼ機能を有する。タンパク質NS4AはNS3-プロテアーゼのコファクターである。タンパク質NS4Bの機能はわかっていない。

【0006】このオープンリーディングフレームは、5'末端に約340個のヌクレオチドの長さの翻訳されない領域（NTR=non-translated region）があり、これは内部のリボソームエンタリー位置（IRES=internal ribosome entry site）として機能し、3'末端には約230個のヌクレオチドの長さのNTRがあり、これは高い可能性でゲノム複製にとって重要である。このような3' NTRはPCT/US96/14033の特許出願の対象である。ポリタンパク質のアミノ末端区域中の構造タンパク質は、宿主細胞のシグナルペプチダーゼにより分解される。非構造タンパク質（NS）2～（NS）5Bは2つのウイルス酵素によって、つまりNS2-3及びNS3/4Aプロテイナーゼによってプロセシングされる。このNS3/4AプロテイナーゼはNS3のカルボキシ末端の向こう側の全ての分解にとって必要である。NS4Bの役割は未だ明らかではない。NS5Aは高度にリン酸化されたタンパク質であり、インターフェロンに対する多様なHCV-遺伝子型の耐性に関与していると考えられ（Enomoto et al. 1995, J. Clin. Invest. 96, 224; Enomoto et al. 1996, N. Engl. J. Med. 334, 77; Gale Jr. et al. 1997, Virology 230, 217; Kaneko et al. 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 320; Reed et al., 1997, J. Virol. 71, 7187参照）、NS5BはRNA依存性のRNAポリメラーゼとして同定された。

【0007】この認識をもとにして、RT-PCR（=逆転写ポリメラーゼ連結反応）を用いた患者の血清中でのHCV特異的抗体の検出に基づくか又はHCV特異的RNAの検出に基づく診断系が開発され、この診断系は通常の及び/又は規定に従い全ての保存血液において適用しなければならない。

【0008】Genoms 1989の最初の記載以来、PCR法を用いてHCVの多数の部分配列及び完全配列がクローニングされ、特性決定された。この配列の比較は、ウイルスゲノムの特にNS5B-遺伝子の領域内での高い変異性を示し、これは最終的に6つの遺伝子系に分類され、これらはさらにサブタイプa、b及びcに細分化される。ゲノムの分散はゲノムにわたって均質に分布していない。従って、5' NTR及び3' NTRの一部は高

い確率で維持されているが、一方で特定のコードする配列、特にコートタンパク質E1及びE2は現在きわめて著しく変化している。

【0009】クローニングされ、特性決定されたHCVゲノムの部分配列及び完全配列はさらに見込みのある抗ウイルス性治療薬のための適当な攻撃標的として研究された。この場合、このような攻撃標的として考えられる3つのウイルス性酵素が発見された。これらは(1)NS3/4Aプロテアーゼ複合体、(2)NS3ヘリカーゼ及び(3)NS5B RNA-依存性RNAポリメラーゼである。NS3/4Aプロテアーゼ複合体及びNS3ヘリカーゼはすでに結晶化され、その3次元構造に関して解明することができており (Kim et al., 1996, Cell, 87, 343; Yem et al., 1998, Protein Science, 7, 837; Love et al., 1996, Cell, 87, 311; Kim et al., 1998, Structure, 6, 89; Yao et al., Nature Structural Biology, 4, 463; Cho et al., 1998, J. Biol. Chem., 273, 15045)、NS5B RNA依存性RNAポリメラーゼの解明が今日までなお成功していない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】この酵素を用いた重要な攻撃標的は慢性HCV感染の治療法の開発のために定義されているにもかかわらず、かつ「合理的ドラッグデザイン」を用いて並びに「高いスループットスクリーニング」を用いて世界的に適当な阻害剤を集中的に探しているにもかかわらず、この治療法の発展は著しい欠乏に直面している、つまり、HCV-RNA又はHCV-抗原を直接、信頼できるかつ実験室で通常の簡単な方法で検出できる細胞培養系又は簡単な動物モデルの欠乏に直面している。このような細胞培養系の不足は、HCV複製の理解が今日までなお不備でありかつかなりの部分で未だ仮説であることに対する主要な原因である。

【0011】専門分野の解釈によると、HCVとフラビウイルス及びペスチウイルスとの間に狭い進化的関連があり、多様な細胞系において簡単に複製することができかつこの場合比較的高い収率が示されている自律複製RNAについて説明されているにもかかわらず (Khromykh et al., 1997, J. Virol. 71, 1497; Behrens et al., 1998, J. Virol. 72, 2364; Moser et al., 1998, J. Virol. 72, 5318参照)、HCVを用いた同様な試験は今まで成果がなかった。

【0012】HCV含有の高力価の (hochtitrig) 患者の血清で感染させることができる細胞系又は初代細胞培養は多様な刊行物から公知であるが (Lanford et al. 1994, Virology 202, 606; Shimizu et al. 1993, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90, 6037-6041; Mizutani et al. 1996, Journal of Virology, 70, 7219-7223; M. Ikeda et al. 1998, Virus Res. 56, 157; Fournier et al. 1998, J. Gen. Virol. 79, 2376及びそこで引用された文献, Ito et al. 1996,

Journal of General Virology, 77, 1043-1054)、ウイルス感染された細胞系又は細胞培養はHCV-RNA又はHCV-抗原は直接検出されなかった。この細胞中のウイルス性のRNAはノーザンブロット (RNAの定量的検出のための標準的方法) においても検出できず、ウェスタンブロットにおいて又は免疫沈降を用いてもウイルス性タンパク質は検出できない。著しく煩雑でかつ間接的方法を用いて、HCV複製を証明することができたにすぎない。この不利な状況は、この公知のウイルス感染した細胞系又は細胞培養中での複製が全く不十分であることを明らかに示している。

【0013】さらに、Yoo et al. (1995, Journal of Virology, 69, 32-38) 及び Dash et al., (1997, American Journal of Pathology, 151, 363-373) の刊行物から、肝癌細胞系を、クローニングされたHCV-ゲノムのインビトロ転写を用いて得られた合成HCV-RNAでトランスフェクションできることが公知である。この2つの文献においてこの著者は、ウイルス性HCV-ゲノムがプラス鎖-RNAであり、このRNAは細胞中へ導入した後に直接mRNAとして機能し、これにリボソームが付着し、翻訳プロセスの進行においてウイルスタンパク質を形成し、このタンパク質から最終的に新規のHCV-粒子が形成される (できる) という基本思想から出発している。このウイルス複製、つまり新規に形成されたHCV-ウイルスもしくはそのRNAは、RT-PCRを用いて検出された。しかしながら、実施されたRT-PCRの発表された結果は、記載されたHCV-トランスフェクションされた肝癌細胞内でHCV複製の効率は著しくわずかであり、見込みのある抗ウイルス療法を用いた意図的な影響による複製率における変動を質的に、ましてや定量的に測定するためにはいずれの場合も不十分である。さらに、先行技術において、高保存3' NTR (hochkonservierte 3' NTR) はウイルス複製のために不可欠であることは公知であり (Yanagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2291-95, 1999)、このことはHCV-ゲノムの確かな3' 末端を知らずに試験したためもっぱら短縮された3' NTRを有するHCV-ゲノムを使用したYoo et al. 及びDash et al. の主張と明らかに矛盾している。

【0014】

【課題を解決するための手段】この課題の解決策は、冒頭に記載した種類の細胞培養系を提供することであり、その際、真核細胞はヒト細胞、特に市販の肝癌細胞系から由来するが、同様に相応する初代細胞培養から得ることができる肝癌細胞であり、その際、導入されたHCV-特異的遺伝子材料がHCV-RNA-構築物であり、この構築物は主にHCV-特異的RNA-断片5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B及び3' NTRを、有利に前記の順序で、及び少なくとも1つの選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を包

含する。「NTR」は本願明細書中で「非翻訳領域」を意味し、これは当業者に概念並びに略語として公知及び周知である。「HCV-RNA-構築物」の概念は本願明細書において完全なHCV-ゲノムを含有する構築物でも、単にそのHCV-ゲノムの一部、つまりHCV-サブゲノムを含有する構築物でもある。

【0015】実際に著しく有利である本発明による細胞培養系の有利な変異形は、DSMACC 2394の番号の元で(実験室記号HuB19-13) DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, Deutschland) に寄託されている。

【0016】本発明による細胞培養系を用いて初めて、HCV-RNAは細胞内で、自律的に及び十分に大量に複製及び発現され、その結果、HCV-RNA-量並びにHCV-特異的タンパク質の定量的測定を通常の、信頼できる正確な生化学的測定方法を用いて実施することができるインビトロ系が提供される。つまり、抗ウイルス性医薬の開発及び検査のために必要なほぼ信頼できる細胞ベース (cell-based) の複製系が提供される。この試験系は有効なHCV特異的な治療法のための潜在的攻撃標的を同定し、かつHCV化学療法剤を開発及び評価することを可能にする。

【0017】本発明は、少なくとも5' 及び3' 非翻訳領域 (NTR) 及び非構造タンパク質 (NS) 3~5Bを包含し、さらに選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を有するHCV-RNA-構築物で細胞をトランスフェクションした場合に、HCV-RNAの有効な複製が細胞中で行われるという意外な認識に基づく。構造遺伝子が複製の進行のためにあまり重要でなく、他方でこのトランスフェクションされた細胞がHCV-RNAと結合した選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) により媒介される永続的な選択圧力を被る場合にのみHCV-RNAの有効な複製が引き起こされることは明らかである。マーカー遺伝子 (選択遺伝子) は従って、一方でHCV-RNAを生産複製する細胞の選択を誘発させ、他方でRNA-複製の効率を著しく高めると考えられる。

【0018】本発明の対象は、HCV-特異的RNA-断片5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5 40

A, NS5B及び3' NTRを、有利に前記の順序で包含し、さらに選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を包含するセルフリーのHCV-RNA-構築物でもある。

【0019】5' NTRもしくはNS3もしくはNS4AもしくはNS4BもしくはNS5AもしくはNS5Bもしくは3' NTRの概念は、本願明細書において、先行技術においてHCVゲノムのそれぞれ該当する機能的断片についてのヌクレオチド配列として記載されている各ヌクレオチド配列を表す。

【0020】このようなHCV-RNA-構築物の提供が、初めて細胞培養中でのHCV-複製、HCV-発病及びHCV-進化の詳細な分析を可能にする。HCV特異的なウイルス性RNAは、完全なゲノムとして又はサブゲノムとして、任意の量で意図的に製造でき、RNA-構築物を操作し、ひいてはHCV-機能を遺伝学的レベルで研究及び解明する可能性が生じる。

【0021】治療法のための主要な攻撃標的として現在研究されている全てのHCV-酵素、つまりNS3/4Aプロテアーゼ、NS3ヘリカーゼ及びNS5Bポリメラーゼは本発明によるHCV-RNA-構築物中に含まれているため、該当する全ての研究のために使用することができる。

【0022】実地での適用において著しく良好であるHCV-RNA-構築物の実施態様は、配列表の配列番号1によるヌクレオチド配列を包含することを特徴とする。実地での使用のために同等に良好な特性を有する他の実施態様は、配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号4又は配列番号5又は配列番号6又は配列番号7又は配列番号8又は配列番号9又は配列番号10又は配列番号11によるヌクレオチド配列を包含することを特徴とする。

【0023】本発明によるHCV-サブゲノム-構築物は、先行技術において今まで未知のヌクレオチド配列、つまり次に記載するヌクレオチド配列 (a) ~ (i) のグループから選択されるヌクレオチド配列を有する3' NTRを備えることができる。

【0024】

【外2】

- 11 12
- (a) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTTTTA
GCTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTGTAGAGAGAGAGTCTCACTCTGTTGCC
AGACTGGAGT
- (b) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCAGACT GGAGC
- (c) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTAATCTTT TTTTTTTTCT TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCAGACT GCAGC
- (d) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (e) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (f) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (g) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (h) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTTAAT CTTTTTTTTT TTTTCTTTT TTTTGAGAGA
GAGAGTCTCA CTCTGTTGCC CAGACTGGAG T
- (i) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTTTTTAAT CTTTTTTTTT TTTTCTTTT TTTTGAGAG
AGAGAGTCTC ACTCTGTTGC CCAGACTGGA GT

【0025】本発明によるHCV-RNA-構築物中に
含まれる選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）は有 30
利に耐性遺伝子、特に抗生物質耐性遺伝子である。

【0026】これは、例えば抗生物質耐性遺伝子の場合
には該当する抗生物質を細胞培地に添加することによっ
て、この構築物でトランスフェクションされた細胞が、
トランスフェクションされていない細胞から容易に選択
することができるという利点を有する。「抗生物質」と
は本願明細書中ではトランスフェクションされていない
宿主細胞又はHCV-RNAをわずかな効率でしか複製
していない細胞の生存及び成長を阻害する物質、特に細
胞毒、例えばピューロマイシン、ハイグロマイシン、ゼ
オシン（Zeocin）、ブレオマイシン又はプラストサイジ
ンであると解釈される。 40

【0027】実地において著しく良好であるとされた特
に良好な選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）もし
くは耐性遺伝子は、ネオマイシンホスホトランスフェラ
ーゼ遺伝子である。

【0028】抗生物質耐性遺伝子の他のものは、例えば
HAT-選択を用いて実施することができるチミジン-
キナーゼ遺伝子である。

【0029】選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子） 50

もしくは有利な耐性遺伝子もしくは特に有利な抗生物
質耐性遺伝子のHCV-RNA-構築物中の位置は、有利
にHCV 5' NTRの後方に、つまり5' NTRの下
流にもしくはHCV-読み枠の上流にある。しかしなが
ら、3' NTRの領域内又はHCV-ゲノム又はHCV
-サブゲノムの他の部位、例えばポリタンパク質の範囲
内にあることも考えられる。

【0030】本発明によるHCV-RNA-構築物のも
う一つの実施態様において、選択可能なマーカー遺伝子
（選択遺伝子）、特に抗生物質耐性遺伝子は、リボザイ
ムを介してもしくはリボザイムに対する認識部位を介し
てHCV-RNAもしくはHCV-ゲノム配列又はサブ
ゲノム配列と結合している。

【0031】このために、HCV-RNAを産生複製す
るような細胞の選択を行うことにより、そこから得られ
た細胞クローンは耐性遺伝子をHCV-サブゲノム配列
のリボザイム媒介性分解により分離することができるこ
とが、つまりクローニングにより組み込まれたリボザイ
ムの活性化によるか、又はリボザイムに対する認識部位
を有する構築物の場合には細胞中へリボザイムを（例え
ばリボザイム構築物のトランスフェクション又は相応す
るリボザイムが導入されたウイルス性発現ベクターでの

感染により) 導入することにより分離できることが有利である。このように、確かな感染性ウイルス粒子の形成が可能である耐性遺伝子を有する確かなHCV-ゲノム-構築物が得られる。

【0032】本発明によるHCV-RNA-構築物のもう一つの有利な実施態様は、構築物が少なくとも1つの組み込まれたリポーター遺伝子を有することにより優れている。

【0033】リポーター遺伝子とは、このリポーター遺伝子の存在で目的生物中へ導入することにより容易に及び一般的に簡単な生化学的又は組織化学的方法で検出可能である、つまり少量であっても実験室で通常の測定方法を用いて簡単でかつ確実に検出及び定量化することができるタンパク質をコードするような遺伝子であると解釈される。

【0034】HCV-RNA-構築物のこの変異形は、この構築物の複製の程度がリポーター遺伝子産物によって簡単にかつ迅速に実験室で通常の方法により測定できるという利点を有する。

【0035】このリポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ遺伝子のグループ、CAT-遺伝子(クロラムフェニコール-アセチルトランスフェラーゼ-遺伝子)、lacZ-遺伝子(ベクター-ガラクトシダーゼ-遺伝子)、GFP-遺伝子(緑色-蛍光-タンパク質-遺伝子)、GUS-遺伝子(グルクロニダーゼ-遺伝子)又はSEAP-遺伝子(分泌-アルカリ性-ホスファターゼ-遺伝子(Sezernerte-Alkalische-Phosphatase-Gen))からの遺伝子が有利である。このリポーター遺伝子もしくはその産物、つまり相応するリポータータンパク質は、例えば蛍光、化学ルミネッセンス、比色法又は免疫法(例えばELISA)を用いて測定することができる。

【0036】リポーター遺伝子として、代理マーカー遺伝子(Surrogatmarkergen)も挙げられる。この遺伝子は本願明細書において、細胞タンパク質、核酸又は一般にウイルス複製に依存するバリエーションの影響下にあるような機能をコードし、かつその結果HCVもしくはHCV-RNA-構築物を増幅する細胞中で抑制又は活性化される遺伝子と解釈される。つまり、この機能の低下もしくは活性化は、ウイルス複製用もしくはHCV-RNA-構築物の複製用の代用マーカーである。

【0037】リポーター遺伝子及び選択可能なマーカー遺伝子(選択遺伝子)の位置は、両方の遺伝子産物から形成される融合タンパク質を発現するように選択することができる。この場合、両方の遺伝子がHCV-RNA-構築物中に配置されており、両方の発現されたタンパク質は、プロテアーゼ(例えばユビキチン)の切断部位又は自己切断するペプチド(例えばピコルナウイルスの2A-タンパク質)を介して融合されていて、後になってタンパク質分解により再び分離されるという有利な可能性が生じる。

【0038】同様に、この両方の位置は、両方の遺伝子産物が別々に発現されるように相互に隔てられていてもよい(例えば次の順序: マーカー遺伝子もしくは耐性遺伝子-内部のリボソーム結合部位-リポーター遺伝子)。

【0039】リポーター遺伝子の場合には、リポーター遺伝子がHCV-ゲノム又はHCV-サブゲノムのオープンリーディングフレーム中へクローニングにより導入されていて、つまりタンパク質分解のプロセッシングによって活性形に変換されるような実施態様が特に有利である。

【0040】全てのバリエーションにおける本発明による細胞培養系は多様な目的のために使用することができる。これは次のことを包含する:

- ・ 抗ウイルス性に作用する物質の探索。これは例えば、直接又は間接的にウイルス増加に影響する有機化合物(例えばウイルス性プロテアーゼ、NS3-ヘリカーゼ、NS5B-RNA依存性RNAポリメラーゼの阻害剤)、HCV-RNA-構築物内の任意の標的配列(例えば5' NTR)にハイブリダイズし、ウイルス増加に直接又は間接的に影響するアンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば任意のHCV-RNA-配列を分解し、それによりウイルス複製を妨害するHCV-ポリタンパク質又はリボエンザイムの翻訳の減少に基づく)。

【0041】・ 細胞培養中での抗ウイルス性に作用する各種の物質の評価。このような物質は例えば単離生成された酵素に関して「合理的ドラッグデザイン(rational drug design)」を用いて並びに「高いスループットスクリーニング(high-throughput screening)」を用いて見出すことができる。評価とは、特に相応する物質の阻害特性の測定並びにその作用メカニズムの決定であると解釈される。

【0042】・ HCV特異的抗ウイルス療法のためのウイルス性又は細胞性の起源の新規の攻撃標的の同定。例えば細胞タンパク質がウイルス増殖のために重要である場合には、この細胞タンパク質の阻害によってウイルス増殖に影響を及ぼすことができる。このような補助的因子の探索は本発明による系を用いて可能である。

【0043】・ 耐性測定のための使用。HCV-ゲノムの高い突然変異誘発率に基づき治療法に対する耐性が生じることがある。このような耐性は物質の臨床的認可の際に重要であり、本発明による細胞培養系を用いて測定できる。HCV-RNA-構築物もしくはHCV-ゲノム又はサブゲノムを複製する細胞系は、相応する物質の濃度を増加させながらインキュベートし、ウイルスRNAの複製を導入したリポーターにより又はウイルス性の核酸又はタンパク質の定性的又は定量的測定により決定する。HCV-RNAの(例えばRT-PCRを用いた)再クローニング及び配列分析により治療の耐性に原因のあるヌクレオチドもしくはアミノ酸交換率を算出

することができる。

【0044】・ 診断薬の開発及び／又は評価のための確かなウイルスタンパク質（抗原）の製造。本発明による細胞培養系は細胞培養中でのHCV-抗原の発現を可能にする。この抗原は、特に診断検出法の構築のためにも使用できる。

【0045】・ 特に治療法及びワクチンの開発及び製造のため並びに診断目的のためのHCVウイルス及びウイルス様粒子の製造。本発明による細胞培養系を用いて製造することができる特に細胞培養に適合した完全なHCV-ゲノムは、細胞培養中で高い効率で複製することができる。このゲノムはHCVの全ての機能を有しており、従って感染性のウイルスを製造できる。

【0046】想定される本発明によるHCV-RNA-構築物は、その全てのバリエーションにおいて多方面の目的のために使用することができる。これには特に次のことが属する：

・ 弱毒化C型肝炎ウイルス又はHCV様粒子の構築及びその細胞培養中での製造：偶然又は意図的に引き起こされた突然変異、例えば点突然変異、欠失又は挿入により、弱毒化HCV粒子又はHCV様粒子を製造することができる、つまり完全に複製能力を有するが、病原性は少ないか又は失っているウイルスもしくはウイルス様粒子を製造することができる。このような弱毒化HCV粒子又はHCV様粒子は特にワクチンとして使用可能である。

【0047】・ 例えば遺伝子治療における肝細胞特異的遺伝子輸送体として使用するための外来遺伝子を組み込まれたHCV-RNA-構築物の構築。HCVの優れた向肝細胞性及びそのゲノムの一部を異種配列に置き換えるという理由から、例えば構造タンパク質を治療上有効な遺伝子に置き換えたHCV-RNA-構築物を製造できる。こうして得られたHCV-RNA-構築物は欠損するHCV機能、例えば構造タンパク質を構成的に又は誘導可能に発現する細胞内へ有利にトランスフェクションによって導入される。「トランス相補性 (Transkomplementation)」の概念のもとで当業者に公知のこの技術により、HCV-RNA-構築物が組み込まれたウイルス粒子を製造することができる。こうして得られた粒子は有利に肝細胞に感染させるために使用することができる。この細胞内で治療上有効な外来遺伝子を発現させ、それにより治療作用を発揮させる。

【0048】・ 生産的なウイルスの増加が行われる許容細胞の探索。この目的のために、完全な感染性ウイルスの形成が可能である前記のHCV-RNA-ゲノム構築物の一つを使用するか、又はこれらの構築物は前記のHCV-サブゲノム-構築物の一つを使用し前記の例に従って欠損する機能を構成的に又は誘導可能に発現する細胞系中へトランスフェクションされる。この全ての場合に、付加的にHCV-配列に耐性遺伝子及び／又はリ

ポーター遺伝子を有するウイルス粒子が生じる。HCVを複製することができる細胞を探索するために、この細胞をこうして製造されたウイルスで感染させ、抗生物質により選択するか又はHCV-RNA-構築物に依存してリポーター遺伝子の発現の検出を調査する。HCV-RNA-構築物を複製する場合、抗生物質耐性もしくはリポーター遺伝子の発現は検出可能であるため、こうして見出された細胞は許容性でなければならない。このように、ほぼ任意の細胞系又は初代細胞がその許容性について試験され、探索される。

【0049】本発明による細胞培養系は、HCV-RNA-複製の範囲内で偶然に生じるか又はこの構築物中へ意図的に導入される突然変異に基づき、複製効率の向上を引き起こすHCV-RNA-構築物の探索を可能にする。HCV-RNA-構築物の複製を変化させるこのような突然変異は、当業者には適合突然変異 (adaptive Mutationen) として公知である。本発明は従って、細胞培養に適した突然変異体を獲得する方法でもあり、その際、この突然変異体はオリジナルのHCV-RNA-構築物と比べて高められた複製効率を有する。本発明はさらに、オリジナルのHCV-RNA-全長ゲノム又はHCV-RNA-部分ゲノム又はHCV-RNA-構築物と比較して高められた複製効率を有するHCV-RNA-全長ゲノム又はHCV-RNA-部分ゲノム又は任意のHCV-RNA-構築物の突然変異体の製造方法を並びにオリジナルの構築物、部分ゲノム又は全長ゲノムと比較して高められた複製効率を有するHCV-RNA-構築物、HCV-全長ゲノム及びHCV-部分ゲノムを包含する。

【0050】突然変異体がHCV-RNA-構築物に比べて高められた複製効率を有する本発明によるHCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得するための本発明による方法は、導入されたHCV-特異的遺伝子材料が請求項2から8までのいずれか1項記載の選択遺伝子を有するHCV-RNA-構築物である請求項1記載の細胞培養系を、選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンからHCV-RNA-構築物を単離することを特徴とする。

【0051】この製造方法の有利な実施態様において、単離されたHCV-RNA-構築物は新たに少なくとも1回継代される、つまり請求項1による細胞培養系の細胞に導入され、導入されたHCV-特異的遺伝子材料が選択遺伝子を有する単離されたHCV-RNA-構築物である請求項1によるその際得られた細胞培養系を選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、このクローンからHCV-RNA-構築物を単離する。

【0052】この変更された方法を用いて適合突然変異の程度ひいては複製効率の程度は該当するHCV-RN

A-構築物中でお高めることができる。

【0053】オリジナルのHCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノム又はHCV-RNA-構築物と比較して高められた複製効率を有するHCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノム又は任意のHCV-RNA-構築物の突然変異体を製造する本発明による方法は、前記の2つの製造方法を用いて、HCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を製造し、これを細胞から単離し、先行技術において公知の方法でクローニングし、配列決定し、オリジナルのHCV-RNA-構築物のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列と比較して、突然変異の種類、数、及び位置を決定し、かつこの突然変異を意図的な突然変異誘発又は該当する突然変異を有する配列断片の置換により、(単離された)HCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノム又は任意のHCV-RNA-構築物中へ導入することを特徴とする。

【0054】実際に複製を変化させる及び特に複製を向上させる突然変異の検出もしくは照合のために、特定のヌクレオチド置換及び／又はアミノ酸置換をオリジナルのHCV-RNA-構築物内へ導入し、これを再び細胞培養中へ導入する試験を実施することができる。導入された突然変異が実際に複製を向上させる場合には、選択可能なマーカー遺伝子を有するHCV-RNA-構築物の場合に、人工的に突然変異誘発された構築物において耐性の細胞クローンの数が未処理の構築物の際よりも明らかに高くなる。

【0055】高められた複製効率を有する本発明による細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物は、ヌクレオチド置換及び／又はアミノ酸置換により請求項2から8のいずれか1項記載のHCV-RNA-構築物から誘導可能であり、2つの前記製造方法を用いて得ることができることを特徴とする。

【0056】この細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物は、高められた複製効率を有する任意のHCV-RNA-構築物又はHCV-全長ゲノム又は部分ゲノムを製造するために使用することができる。この場合、選択可能な耐性遺伝子を有する構築物並びにこのような耐性遺伝子なしのもしくは選択可能なリポーター遺伝子(例えばルシフェラーゼ)を有する構築物を製造することができる、それというのも細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物の高い複製効率に基づき、この複製を選択されていない細胞中でも検出することができるためである。

【0057】オリジナルのHCV-RNA-構築物又はオリジナルのHCV-全長ゲノムと比較して高められた複製効率を有する、HCV-RNA-構築物又はHCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノムの本発明による細胞培養に適合した突然変異体は、細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物中に、配列分析及び配列比較により、突然変異の種類及び数を決定し、この突然変異をH

CV-RNA-構築物中へ、特に請求項2から8までのいずれか1項記載のHCV-RNA-構築物中へ意図的な突然変異誘発によるか又は該当する突然変異を有する配列断片の置換により導入する方法により得られることを特徴とする。

【0058】高いか又は著しく高い複製効率及び実地の適用のために著しく良好な適性を有する特に有利なHCV-RNA-構築物、HCV-全長ゲノム及びHCV-部分ゲノムのグループは、これが表3に記載した全てのアミノ酸置換もしくはヌクレオチド置換及び／又は次の1以上のアミノ酸置換：1283 arg → gly、1383 glu → ala、1577 lys → arg、1609 lys → glu、1936 pro → ser、2163 glu → gly、2330 lys → glu、2442 ile → val(この数はHCV-単離体con1のポリタンパク質のアミノ酸位置に関する、表1参照)を有することを特徴とする。

【0059】配列表に示される配列の個々の特性

配列番号：1

名称：1389/Core-3' / wt

構造(ヌクレオチド位置)：

1. 1~341：HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193：HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1202~1812：脳筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~10842：コアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~2385：HCVコアタンパク質；構造タンパク質
6. 2386~2961：コートタンパク質1(エンペロブタンパク質1)；構造タンパク質
7. 2962~4050：コートタンパク質2(エンペロブタンパク質2)；構造タンパク質
8. 4051~4239：タンパク質p7
9. 4240~4890：非構造タンパク質2(NS2)；HCVのNS2-3プロテアーゼ
10. 4891~6783：非構造タンパク質3(NS3)；HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
11. 6784~6945：非構造タンパク質4A(NS4A)；NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946~7728：非構造タンパク質4B(NS4B)
13. 7729~9069：非構造タンパク質5A(NS5A)
14. 9070~10842：非構造タンパク質5B(NS5B)；RNA依存性RNAポリメラーゼ

15. 10846~11076: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 2

名称: I337/NS2-3' /wt

構造 (ヌクレオチド位置):

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1181: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1190~1800: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1801~8403: 非構造タンパク質2から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1801~2451: 非構造タンパク質2 (NS2); HCVのNS2-3プロテアーゼ
6. 2452~4344: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
7. 4345~4506: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
8. 4507~5289: 非構造タンパク質4B (NS4B)
9. 5290~6630: 非構造タンパク質5A (NS5A)
10. 6631~8403: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
11. 8407~8637: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 3

名称: I389/NS3-3' /wt

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~7767: 非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~3708: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
6. 3709~3870: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3871~4653: 非構造タンパク質4B (NS4B)
8. 4654~5994: 非構造タンパク質5A (NS5A)
9. 5995~7767: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
10. 7771~8001: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 4

名称: I337/NS3-3' /wt

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1181: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1190~1800: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1801~7758: 非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1801~3696: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
6. 3697~3858: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3859~4641: 非構造タンパク質4B (NS4B)
8. 4642~5982: 非構造タンパク質5A (NS5A)
9. 5983~7755: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
10. 7759~7989: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 5

名称: I389/NS2-3' /wt

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~8418: 非構造タンパク質2から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~2463: 非構造タンパク質2 (NS2); HCVのNS2-3プロテアーゼ
6. 2464~4356: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
7. 4357~4518: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
8. 4519~5301: 非構造タンパク質4B (NS4B)
9. 5302~6642: 非構造タンパク質5A (NS5A)
10. 6643~8415: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
11. 8419~8649: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 6

名称: I389/NS3-3' /9-13F

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
 2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
 3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
 4. 1813~7767: 細胞培養に適合した突然変異体9-13Fの非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
 5. 1813~3708: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
 6. 3709~3870: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
 7. 3871~4653: 非構造タンパク質4B (NS4B)
 8. 4654~5994: 非構造タンパク質5A (NS5A)
 9. 5995~7767: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
 10. 7771~8001: HCVの3' 非翻訳領域
- 配列番号: 7

名称: I389/core-3' / 9-13F

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~10842: 細胞培養に適合した突然変異体9-13Fのコアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~2385: HCVコアタンパク質; 構造タンパク質
6. 2386~2961: コートタンパク質1 (エンペローブタンパク質1); 構造タンパク質
7. 2962~4050: コートタンパク質2 (エンペローブタンパク質2); 構造タンパク質
8. 4051~4239: タンパク質p7
9. 4240~4890: 非構造タンパク質2 (NS2); HCVのNS2-3プロテアーゼ
10. 4891~6783: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
11. 6784~6945: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946~7728: 非構造タンパク質4B (NS4B)

13. 7729~9069: 非構造タンパク質5A (NS5A)

14. 9070~10842: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ

15. 10846~11076: HCVの3' 非翻訳領域

配列番号: 8

名称: I389/NS3-3' / 5.1

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
 2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
 3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
 4. 1813~7767: 細胞培養に適合した突然変異体5.1の非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
 5. 1813~3708: 非構造タンパク質3 (NS3); HCVのNS3プロテアーゼ/ヘリカーゼ
 6. 3709~3870: 非構造タンパク質4A (NS4A); NS3プロテアーゼのコファクター
 7. 3871~4653: 非構造タンパク質4B (NS4B)
 8. 4654~5994: 非構造タンパク質5A (NS5A)
 9. 5995~7767: 非構造タンパク質5B (NS5B); RNA依存性RNAポリメラーゼ
 10. 7771~8001: HCVの3' 非翻訳領域
- 配列番号: 9

名称: I389/core-3' / 5.1

構造 (ヌクレオチド位置)

1. 1~341: HCVの5' 非翻訳領域
2. 342~1193: HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質; 選択可能なマーカー
3. 1202~1812: 脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位; その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813~10842: 細胞培養に適合した突然変異体5.1のコアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813~2385: HCVコアタンパク質; 構造タンパク質
6. 2386~2961: コートタンパク質1 (エンペローブタンパク質1); 構造タンパク質
7. 2962~4050: コートタンパク質2 (エンペローブタンパク質2); 構造タンパク質
8. 4051~4239: タンパク質p7

9. 4240～4890：非構造タンパク質2（NS2）；HCVのNS2-3プロテアーゼ
10. 4891～6783：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
11. 6784～6945：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946～7728：非構造タンパク質4B（NS4B）
13. 7729～9069：非構造タンパク質5A（NS5A）
14. 9070～10842：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ
15. 10846～11076：HCVの3' 非翻訳領域

配列番号：10

名称：I389／NS3-3'／19

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5' 非翻訳領域
2. 342～1193：HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質； 20
3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813～7767：細胞培養に適合した突然変異体19の非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813～3708：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
6. 3709～3870：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3871～4653：非構造タンパク質4B（NS4B）
8. 4654～5994：非構造タンパク質5A（NS5A）
9. 5995～7767：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ
10. 7771～8001：HCVの3' 非翻訳領域

配列番号：11

名称：I389／core-3'／19

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5' 非翻訳領域
2. 342～1193：HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質； 選択可能なマーカー
3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813～10842：細胞培養に適合した突然変異体19のコアから非構造タンパク質5BまでのHC 50

Vポリタンパク質

5. 1813～2385：HCVコアタンパク質；構造タンパク質
6. 2386～2961：コートタンパク質1（エンペローブタンパク質1）；構造タンパク質
7. 2962～4050：コートタンパク質2（エンペローブタンパク質2）；構造タンパク質
8. 4051～4239：タンパク質p7
9. 4240～4890：非構造タンパク質2（NS2）；HCVのNS2-3プロテアーゼ
10. 4891～6783：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
11. 6784～6945：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946～7728：非構造タンパク質4B（NS4B）
13. 7729～9069：非構造タンパク質5A（NS5A）
14. 9070～10842：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ
15. 10846～11076：HCVの3' 非翻訳領域

本発明を以下に実施例ならびにそれに付属する表および図に基づいて詳細に説明する。挙げられる図は以下のことを示す。

【0060】図1A：本発明によるHCV-RNA-構築物の構造

一番上に、完全な親HCVゲノムの構造の略図をポリタンパク質内の分割産物コア、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5AおよびNS5Bのための遺伝子の位置、ならびに5' および3' 非翻訳領域（5' NTRおよび3' NTR）（水平のバーとして示した）、およびサブゲノム構築物の製造のために選択される両方の位置、すなわちNS5B RNAポリメラーゼの“GDD触媒ドメイン”の位置（GDD）およびHCV-IRESの3' 境界部の位置（ヌクレオチド位置1～377もしくは1～389）（ゲノム略図の上方に示した）と一緒に与えた。ゲノム略図の下方の数字は相当するヌクレオチド位置を示している。

40 【0061】前記略図の下に、5' HCV-IRES、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（Neo^r）、EMCV-IRES（E-I）およびNS2もしくはNS3から確かな3' 末端までのHCV配列からなる本発明による2つの改変したHCV-RNA構築物（サブゲノム）の略図を示している。NS5BポリメラーゼGDDモチーフを含む10アミノ酸の欠失位置をそれぞれ三角形（Δ）で印す。

【0062】図1B：トランスフェクションして継代培養されたHu h-7細胞クローンにおける複製されたプラス鎖RNAの検出のための変性ホルムアルデヒドア

ガロースゲル電気泳動の結果

HCV特異的RNAの位置(矢印)および28S rRNAの位置をレーン12の右側に示し、RNAマーカー(M)のサイズ(ヌクレオチド数)をレーン1の左側に示した。

【0063】図1C: 選択された大部分の細胞クローンにおいて導入されたレプリコンDNAが存在しないことを証明するための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果

レーン1およびレーン2はポジティブコントロールを示し、レーン13はネガティブコントロールを示している。レーン1の左に示された数字はヌクレオチドマーカー分子のサイズを明示している。

【0064】図2A: HCV-RNA構築物を有する細胞クローン(9-13)における導入されたレプリコンDNA(プラスミド分子I₃₇₇/NS3-3'/wt)の高感度の排除のための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果

レーン7~レーン11は細胞クローン9-13の全DNAを添加しない構築物I₃₇₇/NS3-3'/wtのDNA分子の検量の結果を表し、かつレーン2~レーン6はPCR前にその都度1μgの9-13 DNAを添加した(DNA調製におけるPCRのインヒビターの排除のため)同一のプラスミド分子を表す。レーン13はネガティブコントロール(DNAプローブ無しでのPCR)を表す。レーン1は細胞クローン9-13の全DNA 1μgを使用して得られた結果を示している。

【0065】図2B: HCVのプラス鎖RNAおよびマイナス鎖RNAの定量のためのノーザンブロット試験の結果

矢印はレプリコンRNAの位置を印している。“プラス”および“マイナス”の移行はゲル上に載せられたRNAコントロールの正(プラス)の極性もしくは負(マイナス)の極性を表す。“マイナス鎖”および“プラス鎖”は放射性RNAプローブの特異性を表す。

【0066】図2C: HCV-RNA複製のダクチノマイシンに対する耐性を証明するための細胞内で複製されたHCV-RNAの放射性標識後のホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動の結果

図3A: 代謝放射性標識後の免疫沈降による選択された細胞クローンにおけるHCV特異抗原の検出

レーン7~レーン9は確かなサイズマーカー(Huh-7細胞中でのHCV-RNA構築物の一過性発現後に得られた)を表し、同定されたHCVタンパク質はレーン1の左端に印し、分子量(キロダルトン)はレーン9の右側に示した。

【0067】図3B: HCV抗原の細胞内での所在の検出のための免疫蛍光試験の結果

図4: 5' HCV-IRES、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(Neo^r)、異種の、例えば脳

心筋炎ウイルスのIRES-エレメント(E-I)、完全なHCV読み枠および確実な3' NTRからなる、本発明による選択可能なHCV-RNA構築物(完全なゲノム)の構造の略図

図5: ポリタンパク質をコードするヌクレオチド配列内に挿入された抗生物質耐性遺伝子(単シストロン性RNA)(A)および3' NTR内に挿入された抗生物質耐性遺伝子(2シストロン性RNA)(B)を有するHCV-RNA構築物の構造の略図

図6: NS3からNS5BまでのHCVレプリコンの一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造(A)(そのリポータータンパク質は最終的にはウイルスまたは細胞のプロテアーゼによってポリタンパク質から分離され、かつ選択可能なマーカー遺伝子(選択遺伝子)もしくは耐性遺伝子は同時トランスフェクションによって細胞中に導入される)、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子(例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質のための遺伝子)からなる融合遺伝子の一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造(B)、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子(例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質のための遺伝子)からなるレプリコンの一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造(C)(これらはプロテアーゼによって分解できるかまたは自己分解(自己触媒)活性を有するアミノ酸配列(斜線の範囲)をコードするヌクレオチド配列中を介して結合している)、自体の内部のリボソーム結合部位(IRES)から発現される独立の遺伝子(ここでは緑色蛍光タンパク質)として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造

(D)(耐性遺伝子(ここではネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子)は自体の内部のリボソーム結合部位(IRES)から独立して同様に発現される)(複シストロン性構築物)の略図

図7: 耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-RNA配列と結合しているHCV-RNA構築物の構造の略図太い線はHCVの5' および3' のNTRを意味し、E-Iは耐性遺伝子の発現のために必須の異種の内部リボソーム結合部位であり、灰色の正方形はリボザイムもしくはリボザイムの認識部位を意味する。

【0068】図8: 耐性遺伝子および組み込まれた外来遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造の略図

図9: 全RNAとインビトロ転写物との比感染力(形成した細胞コロニーの数として示した)の比較のための方法プロセス

HCV-RNAを相応のRNA構築物のインビトロ転写によって製造し、260nmでの光学密度(OD₂₆₀)の測定によって定量した。これらの分子の規定さ

れた数をナイーヴHu h-7細胞の全RNAの一定量と混合し、かつこれらの混合物をエレクトロポレーションを使用してナイーヴHu h-7細胞中に導入した。それに並行して、図1に記載される方法によって製造された細胞クローンの全RNAを従来の技術において公知の方法で単離し、かつそれに含有されるHCV-RNAの量をHCV特異的なRNAプローブを使用するノーザンブロットおよび引き続きのホスホイメージャー (Phosphorimager) による定量によって決定する。全RNAの規定された量をインビトロ転写物と類似にネイティブなHu h-7細胞中にトランスフェクションさせた。次いで両方のバッチ中の細胞はG418選択を実施し、かつ形成したコロニーの数を、固定およびクーマシーブリリアントブルーでの染色の後に計数することによって決定した。トランスフェクション効率の決定のために、各トランスフェクションバッチにルシフェラーゼの発現を可能にするプラスミド1μgを添加した。トランスフェクションした細胞のアリコートを24時間後に収穫し、かつ各細胞溶解物中のルシフェラーゼ活性を決定した。コロニーの数はその都度ルシフェラーゼ発現に基づいて規格化した。

【0069】図10：9-13クローンの配列分析
HCV-RNA構築物I377/NS3-3'のトランスフェクションによって生じる細胞クローン9-13の全RNAを従来の技術において公知の方法を使用して単離し、かつヌクレオチド位置59~9386までのHCV-RNA構築物を“長距離RT-PCR (long-distance RT-PCR)”を使用してプライマーS59およびA9413の使用下に増幅させた。PCR断片をクローニングし、かつ11個のクローン(9-13A~Kと呼ぶ)を完全に配列決定し、その際、クローンDおよびクローンI、クローンEおよびクローンGならびにクローンHおよびクローンJは同一であると証明された。再クローニングされたHCV-RNAと親構築物の間のNS3-5B領域におけるアミノ酸差異の位置はそれぞれのクローンにおいて太い垂線で印した。各クローンを制限酵素SfiIで消化し、かつそれぞれの断片を親構築物に挿入した。これらのクローンをそれぞれのHu h-7細胞にトランスフェクションし、該細胞を図1に記載のように選択した。各構築物によって得られる細胞クローンの数は各構築物の右隣に印した。

【0070】図11A：リポーター遺伝子の使用による複製アッセイの原理
この図の上方部分においては、HCV5' NTR (ヌクレオチド位置1~389)、ルシフェラーゼ遺伝子(1uc)、脳筋炎ウイルスのIRES、HCVNS3-5Bおよび3' NTRからなるHCV-DNA構築物I389/Luc/NS3-3'が示されている。不活性化

能力のあるHCV-RNA構築物もしくは欠失HCV-RNA構築物をコードするプラスミドをScaIで消化し、かつT7RNAポリメラーゼによるインビトロ転写において使用した。鋳型DNAの除去後に、それぞれのHCV-RNA構築物をエレクトロポレーションによってナイーヴHu h-7細胞中に導入し、これらを規則的な間隔で収穫した。

【0071】図11B：親HCV-RNA構築物I389/Luc/NS3-3'/wt(wt)または以下の変異体：不活性RNA(318DN)、変異体9-13Fもしくは変異体5.1でトランスフェクションした細胞におけるルシフェラーゼ活性の比較

細胞を、トランスフェクション後の6時間(示されていない)、24時間、48時間、72時間、96時間、120時間、144時間および168時間に収穫し、かつルシフェラーゼ活性を発光測定的に決定した。

【0072】図12：選択可能なHCV全長ゲノム(構築物I389/core-3'/5.1およびI389/core-3'/9-13F)

(A)全長構築物の略図。制限酵素SfiIのための2つの示される認識部位間の範囲は高度に適合したRNA変異体5.1または9-13Fの配列に相当する。

【0073】(B)Aに示される構築物I389/core-3'/5.1のインビトロ転写されたRNA各0.1μgでHUH7細胞にトランスフェクションした後に得られるコロニーの数。代表的な試験の結果を挙げている。

【0074】(C)相応のインビトロ転写物のトランスフェクション後に得られるG418耐性細胞クローンにおける自律的に複製されるHCV全長RNAの検出。図はneo耐性遺伝子およびHCV5' NTRに対するプローブとハイブリダイズしたノーザンブロットのオートラジオグラムを示している。レーン1およびレーン2に示されるコントロールは、ナイーヴHu h-7細胞からの全RNAと混合された挙げられるインビトロ転写物の各10⁸分子に相当する。ネガティブコントロールはナイーヴHu h-7細胞(レーン3)からの全RNAを専ら有している。レーン4~9は、インビトロ転写されたI389/core-3'/5.1-RNAもしくはI389/core-3'/9-13F-RNAでトランスフェクションした後に得られたG418耐性細胞クローンからの全RNA3~10μgを含有している。選択のために使用されるG418濃度をその都度挙げている。示される5個の細胞クローンは高度に適合したRNA変異体5.1(レーン4~8)を有し、1個の細胞クローンは適合したRNA変異体9-13F(レーン9)を有している。

【0075】図13：1つのリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物。(A)2シストロン性HCV-RNA構築物。リポーター遺伝子を別々のIRESを使

用して翻訳した。(B) 単シストロン性HCV-RNA構築物。リポーター遺伝子産物をHCVタンパク質との融合タンパク質として発現させた。2つの成分をウイルスのプロテアーゼもしくは細胞のプロテアーゼのための融合された2つのタンパク質成分のタンパク質分解による分離を可能にする認識配列を介して結合させる。示される例ではリポーター遺伝子産物およびそれぞれのHCVタンパク質をユビキチン(Ub)のための認識配列を介して融合させた。

【0076】図14: 耐性遺伝子に付加的に、挿入された外来遺伝子を有している3シストロン性のHCV-全長RNA構築物。

【0077】図15: 耐性遺伝子がHCV成分を有する融合タンパク質として発現する単シストロン性HCV-RNA構築物。耐性遺伝子(RG)は融合タンパク質として活性であるか、または該遺伝子を、耐性遺伝子産物がHCV成分の細胞性もしくはウイルス性のプロテアーゼによって分解されるように、HCV成分を有するタンパク質分解可能な配列と融合する。示される例では、耐性遺伝子を、ユビキチン(Ub)をコードする配列を介してそれぞれのHCV成分と融合させた。

【0078】

【実施例】例1: HCV-RNA-構築物の製造

(A) RT-PCRを用いた完全HCV-コンセンサスゲノムの合成およびクローニング

慢性に感染した患者の肝臓から、HCV-ゲノム、つまりHCV-RNAを以下の通りに単離した: 肝臓約100mgからChomczynskiおよびSacchi(1987, Anal. Biochem. 162, 15)の方法により完全RNAを単離した。単離したこのRNA1μgを用いて、プライマーA6103 (GCTATCAGCCGGTTCATCCACTGC)またはA9413 (CAGGATGGCCTATTGGCCTGGAG)を有し、かつエキスパンドリバーストランスクリプターゼ(expand reverse transcriptase)システム(Boehringer Mannheim、ドイツ)を用いた逆転写を製造元の指示に従って実施した。この逆転写(RT)生成物を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR=polymerase chain reaction)を、エキスパンドロングテンプレート(expand long template)システム(Boehringer Mannheim、ドイツ)の使用下で実施し、その際、ジメチルスルホキシド2%の含有率を有する緩衝液を使用した。42℃で1時間の後、この反応バッチの1/8を、プライマーA6103およびS59 (TGTC TTCACGCAGAAAGCGTCTAG)、またはA9413およびS4542 (GATGAGCTCGCCGCGAAGCTGTCC)とともに第一のPCRのサイクルにおいて使用した。40サイクル後に、この反応バッチの1/10を、プライマーS59およびA4919 (AGCACAGCCCGCGTTCATAGCAC TCG)、またはS4542およびA9386 (TTA

GCTCCCCGTTTCATCGGTTGG)とともに第二のPCRのサイクルにおいて使用した。30サイクル後に分離用アガロースゲル電気泳動を用いてPCR生成物を精製し、かつその際に溶離した断片をベクターpCR2.1 (Invitrogen)またはpBSKII (Stratagene)中でライゲーションした。それぞれの断片からの4つのクローンを分析し、かつ配列決定し、かつコンセンサス配列を確認した。この目的のためにDNA配列を相互に比較した。断片の1つの配列が残りのものと異なる位置を、不所望の突然変異と見なした。配列が多義性である場合、該当する領域の自体オーバーラップしている比較的短いPCR断片を増幅し、かつ複数のクローンを配列決定した。このようにしてそれぞれの断片中の数多くの潜在的な突然変異を同定し、ひいては単離物-特異的なコンセンサス配列を確定することができた。確定されたこのコンセンサス配列もしくはこのゲノムは、世界的に普及している遺伝子型1bに属する。3'末端における翻訳されなかった領域(=3' NTR)が通常のPCRにより得られ、その際、従来技術において公知の「X-テール(X-tails)」(Tanaka et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 744およびRice, PCT/US96/14033)の最後の24のヌクレオチドを覆うアンチセンスプライマーを使用した。PCRを用いてT7プロモーターの鎖の下流の5'-末端(=5' NTR)における確立された非翻訳領域を発生させ、その際、一方では短縮したT7プロモーター(TAATACGAC TCA CTA TAG)およびHCVの第一の88のヌクレオチドに相当するオリゴヌクレオチドを使用し、かつ他方ではゲノムの5'断片の1つを有する前記のプラスミドを使用した。非コンセンサス交換の数が極めて少ないサブゲノム断片から、完全HCV-コンセンサスゲノムを構成し、かつ改変したpBR322-ベクターに挿入した。部位特異的な突然変異(site-directed mutagenesis)を用いてコンセンサス配列からの差異を排除した。確定された3'末端を有する「ラン-オフ(run-off)」転写を製造するために、単離物の3'-NTR(末端TGTを有する)をAGTに変性し(Kolykhalov et al., 1996, J. Virol. 70, 3363による遺伝子型3=クローン'WS'の配列による)、かつさらに付加的なヌクレオチド交換を位置9562において行い、AT塩基対を3' NTR(Kolykhalov et al., ibid.)の3'末端におけるヘアピン構造中に保持した。酵素Scalのための内部の制限部位を排除するために、さらにいわゆる発現しない(silent)ヌクレオチド交換を行った。適合した5' NTRおよび3' NTRを有する全長のゲノムの連結後に、完全HCV配列を調査した。その際、不所望のヌクレオチド交換は発見されなかった。

【0079】このようにして製造したHCVゲノムは、定義によれば向肝性(hepatotrop)であるべきである。

【0080】(B) 選択可能なHCV-サブゲノム構築物の合成

(A)に記載したコンセンサスゲノムの使用下に、抗生物質耐性遺伝子のネオマイシン-ホスホトランスフェラーゼ(NPT)および内部のリボソーム結合部位(IRES)の2つの配列を有するHCV-サブゲノム-構築物を製造した。このために使用した生化学的なプロセス技術は、当業者に公知であり、かつ周知である(次の文献を参照のこと: Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989, Molecularcloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al. (eds.), 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1-3, John Wiley & Sons Inc., New York)。抗生物質耐性遺伝子を直接5' NTRの後ろに挿入し、このことにより2シストロンのRNAが得られた(図1Aを参照のこと)。しかしまた抗生物質耐性遺伝子はHCV-サブゲノム-構築物の別の部位、例えばポリタンパク質をコードするヌクレオチド配列の内部にもまた同様に良好に挿入することができ、このことにより単シストロンのRNAが得られる(図5Aを参照のこと)か、または3' NTR中に挿入する(図5Bを参照のこと)。IRES-エレメントは一方では両方のHCV-IRES-変異体ヌクレオチド1-377またはヌクレオチド1-389の1つであり、かつ他方ではNS2またはNS3に関する遺伝子の鎖の下流にゲノムの確かな3' 末端までHCV配列の翻訳を制御するエンゼファロマイオカルディティス(Encephalomyocarditis)ウイルスのIRESである。

【0081】前記の両方のHCV-IRES-変異体を以下の通りに確認した: HCV-IRESの3' 境界部の欠失分析法(Reynolds et al., 1995, EMBOJ. 14, 6010)に基づいて、5' NTRの種々の断片をNPT遺伝子と融合し、かつT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を含む有しているプラスミドとの同時トランスフェクションに基づいて、形成されたコロニーの最大数に関して分析した。1-377および1-389のHCV配列で最良の結果が得られた。HCVポリタンパク質のAUG出発コードは位置342に存在し、ひいてはIRES配列中に含有されているので、HCV-カプシドタンパク質(コアタンパク質(Core-Proteins))の12個もしくは16個のアミノ酸とネオマイシンホスホトランスフェラーゼとが融合する(図1Aを参照のこと)。

【0082】従ってこの改変されたHCV-サブゲノム-構築物は名称I₃₇₇/NS2-3' (またはI₃₇₇/NS3-3') およびI₃₈₉/NS2-3' (またはI₃₈₉/NS3-3') を有していた。これらは図1Aに図示されている。

【0083】これらの改変された親HCV-サブゲノム-構築物I₃₇₇/NS2-3' (またはI₃₇₇/NS3-

3') およびI₃₈₉/NS2-3' (またはI₃₈₉/NS3-3') のインビトロ転写を用いて、ヒトの肝細胞の種々の細胞系および一次細胞培養をトランスフェクションした。

【0084】すべてのトランスフェクション実験に並行するネガティブコントロールとして、それぞれの改変親HCV-サブゲノム-構築物に対して、1つの相応して改変したが、しかしサブゲノムは読み枠中で、NS5B

RNAポリメラーゼの活性中心を含む10個のアミノ酸の欠失を有していることにより親サブゲノムから区別される欠損サブゲノムを構成した(Behrens et al., 1996, EMBO J. 15, 12; およびLohmann et al., 1997, J. Virol. 71, 8416)。

【0085】(C) 選択可能なHCV-ゲノム-構築物の合成

5' 末端でルシフェラーゼ遺伝子の断片および完全EMCV-IRESと結合しているNS2-3' サブゲノム構築物を、NcoIおよびSpeIで制限し、かつ分離用アガロースゲル電気泳動を用いて精製した。このようにして得られたベクターを3ファクターライゲーションにおいて、NcoI/NotI-HCV-断片を用いてHCV-ゲノムのヌクレオチド位置342~1968に相応して、およびNotI/SpeI-断片を用いてヌクレオチド位置1968~9605に相応してライゲーションした。その後、完全HCV-読み枠および3' NTRがルシフェラーゼ遺伝子断片およびEMCV-IRESの下流に存在している得られた構築物を、PmeIおよびSpeIで制限し、かつ同様に制限したI₃₈₉/NS3-3' /wt-サブゲノム構築物ベクターを用いてライゲーションした。選択可能なこのHCV-ゲノム構築物が図4に記載されている。

【0086】(D) HCV-RNA-構築物に相応したインビトロ転写物の製造

前記の精製したプラスミドDNAを、ScaIを用いて直線状にし、かつフェノール/クロロホルム抽出およびイソプロパノール沈殿後に次の成分の使用下にインビトロ転写反応で使用した: HEPES 80mM, pH 7.5, MgCl₂ 12.5mM, スペルミジン 2mM, ジチオトレイトール 40mM、それぞれのNTP から2mM、RNasin 1ユニット/μl、制限DNA 50μg/ml およびT7 RNAポリメラーゼ約2ユニット/μl。37℃で2時間後にT7ポリメラーゼの半量を添加し、かつ反応バッチをさらに2時間インキュベーションした。DNAの除去のために、該混合物を酸性フェノールで抽出し(U. Kedzierski, J.C. Porte, 1991, Bio Techniques 10, 210)、イソプロパノールで沈殿し、ペレットを水中に溶解し、かつDNase (DNA μgあたり2ユニット)とともに37℃で60分間インキュベーションした。酸性フェノール、酸性フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムを用いたそ

の後の抽出およびイソプロパノール沈殿の後、溶解したRNAを光学密度測定により定量化し、かつその不確定性をホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動により調査した。

【0087】例2：肝癌細胞系Hu h-7を用いたトランスフェクション実験

すべてのトランスフェクション実験において、それぞれの鋳型DNAをあらかじめ除去して、該DNAがトランスフェクションした細胞に導入され、かつHCVの複製とは無関係にこれらにネオマイシン耐性を媒介することができるということを回避することに慎重に注意を払った。従ってインビトロ転写(例1D)に引き続き、DNA μ gあたり、DNase 2ユニットを用いて反応混合物を37°Cで60分間処理し、かつ酸性フェノール、酸性フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムを用いて抽出した。トランスフェクションのための使用前に、ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動を用いて沈殿したRNAを分析した。

【0088】高度に分化したヒト肝癌細胞系Hu h-7を用いて3つの別々のトランスフェクション実験を実施した(Nakabayashi et al., 1982, Cancer Res. 42, 3858)。その際、エレクトロポレーションを用いてその都度RNA 15 μ gを 8×10^6 Hu h-7細胞中に導入し、かつこれらの細胞を引き続き直径10 cmの培養皿に播種した。播種の24時間後に、ネオマイシン(=G418)を最終濃度1 mg/mlで添加した。培地を週に2回交換した。3~5週間後に小さいコロニーが認識され、これを単離し、かつ同一の培養条件下で継代した。

【0089】第一の実験の経過において得られた細胞クローンを単離し、かつ継代培養した。この手順においてほとんどのクローンが死滅し、かつ最終収率は親HCVサブゲノム構築物でトランスフェクションされていた細胞クローンがわずか9および欠損HCV-ゲノム構築物、つまり欠損NS2-3' HCV-RNAでトランスフェクションされていた細胞クローン1(クローン8-1)であった。短縮された増殖時間および不規則に形成された細胞が時折出現すること以外に、これらの9の細胞クローンと1の細胞クローン(クローン8-1)又は親Hu h-7細胞の間には安定した形態学的な相違は見られなかった。

【0090】機能性HCV-ゲノム構築物に関する主な基準は、正確な大きさを有するウイルスRNAの形成およびG418耐性を転写されたか、もしくは媒介された可能性のある(組み込まれた)プラスミドDNAの不在である。

【0091】Hu h-7細胞中でHCV-RNAを決定するために、全RNAを単離し、かつ慣用のノーザンブロット法を用いてプラス鎖-特異的なリボプローブ(Ribosonde)(RNA-プローブ)の使用下に分析した。

このためにChomczynskiおよびSacci, 1987, Anal. Biochem. 162, 156の方法によりそれぞれの細胞クローンから全RNAを単離し、変性ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動法を用いて全RNA含有率0.5~1 $\times 10^6$ 細胞に相当するRNA 10 μ gを分離した(図1Bのレーン3~12)。確かな配列を有するサイズマーカーとして、I₃₈₉/NS2-3'/wtまたはI₃₈₉/NS3-3'/wtレプリコンRNAに相応する10⁹のインビトロ複写を同時に分離した(レーン1もしくはレーン2)。分離したRNAをナイロンメンブランに移し、かつヌクレオチド377~ヌクレオチド1の完全NPT-遺伝子およびHCV-IRESに対して相補性に放射性標識したプラス鎖-特異的なRNA-プローブを用いてハイブリダイゼーションした。HCV-特異的なRNA(矢印)および28SrRNAの位置は、レーン12の右側に記載されており、RNAマーカーの大きさ(ヌクレオチドの数)は、レーン1の左側に記載されている。RNAマーカーの断片は、HCV配列を有しており、かつ従ってリボプローブとハイブリダイゼーションする。この分析の結果は図1Bに記載されている。

【0092】欠損HCV-ゲノム構築物を用いてトランスフェクションしたクローン8-1を例外として、すべての細胞クローンは正確な長さの均質なHCV-RNAを産出した(NS2-3'の場合、約8640のヌクレオチドおよびNS3-3'レプリコンの場合、約7970のヌクレオチド)。この調査は、機能性レプリコンもしくは機能性HCV-ゲノム構築物が、G418耐性を転写するということの指標である。G418耐性が、Hu h-7宿主細胞のゲノムに組み込まれており、かつ細胞プロモーターのコントロール下で転写されるプラスミドDNAに起因するということを排除するために、NPT遺伝子特異的なPCRを用いてそれぞれのクローンからDNAを調査した。この場合、選択されたHu h-7細胞クローンから、10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5% SDS中のプロテインキナーゼK(40 μ g/ml, 1 h, 37°C)を用いた消化および引き続きフェノール、フェノール/クロロホルムを用いた抽出およびイソプロパノール沈殿によりDNAを単離した。DNA沈殿物を10 mM Tris (pH 7.5)および1 mM EDTA中に溶解し、かつRnase Aを用いて1時間インキュベーションした。フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿に引き続き、4~8 $\times 10^4$ 細胞に相応するDNA 1 μ gを、NPT-遺伝子-特異的なプライマー(5'-TCAAGACCGACCTG TCCGGTGCCC-3'および5'-CTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGC-3')の使用下にPCRを用いて分析し、かつ379のヌクレオチドからなるDNA断片が得られた。PCR生成物の特異性をサザンブロット法を用いて検出し、その際、NPT遺伝子に相応するジゴキ

シグニン標識したDNA断片を使用した。ポジティブコントロールとして、 10^7 のプラスミド分子またはネオマイシン耐性遺伝子を用いて安定にトランスフェクションされたBHK細胞系からのDNA $1 \mu\text{g}$ を用いてPCR法を実施し、かつネガティブコントロールとして、同一であるがしかしDNAを添加しなかった反応試薬を用いてPCRを実施した。

【0093】この調査の結果は図1Cに記載されている。レーン1および2は、ポジティブコントロールを表し、レーン13は、ネガティブコントロールを表す。レーン1の左側の数の表示は、ヌクレオチドマーカ分子の大きさを表している。NS2-3' レプリコン/NS2-3' HCV-ゲノム構築物を用いたトランスフェクションによる細胞に由来するクローン7-3 (図1C、レーン3) 中、および欠損HCV-ゲノム構築物を用いたトランスフェクションによる細胞に由来するクローン8-1 (図1C、レーン12) 中以外には、いずれの細胞クローンでもNPT-DNAを検出できなかった。この調査は、ほとんどのクローンのG418耐性が複製されたHCV-RNAにより媒介されたということのためのさらなる指標である。しかしこの結果とは無関係に、正確な大きさを有するHCV-RNAを組み込まれたプラスミドDNAから製造することはあり得ない。というのもインビトロ転写のために使用されるプラスミドは、真核生物プロモーターもポリアデニル化シグナルも有していないからである。従ってクローン7-3の場合、耐性はおそらくHCV-RNA構築物もしくは複製するHCV-RNAによっても、組み込まれたNPT DNA配列によっても媒介される可能性は極めて高く、その一方でクローン8-1の細胞の耐性はもっぱら導入されたプラスミドDNAに起因する。

【0094】G418耐性が自律的に複製するHCV-RNAにより媒介されていることを証明するためにクローン9-13 (図1B、レーン11) をさらに試験した。NPT-遺伝子の導入されたコピーを有するクローン8-1をあらゆるところでネガティブコントロールとして使用した。クローン9-13中のNPT-DNAの存在を徹底的に排除するという目的で、4000以下の細胞中のNPT-遺伝子コピー1000未満の検出を可能にするPCRを実施した。このPCRの結果は図2Aに記載されている。このPCRの場合、詳細には以下の通りに行った：その都度 $10^6 \sim 10^2$ のプラスミド分子 (I₃₇₇ / NS3-3' / wt) を、直接 (レーン7~11) またはその都度 $1 \mu\text{g}$ の9-13 DNAの添加後 (レーン2~6) に試験で使用した。増幅したDNA断片の特異性を、NPT-特異的なプローブの使用下にサザンブロットを用いて決定した。DNA-プローブを有していないPCRを、ネガティブコントロールとして実施した (レーン12)。

【0095】この高感度な方法を用いても細胞クローン

9-13のDNA μg 中にプラスミドDNAは検出されなかった (レーン1)。これらの細胞中のHCV-プラス鎖およびマイナス鎖のRNAの量を評価するために、プラス鎖およびマイナス鎖特異的な放射性標識したリボプローブ (Ribosonde) (=RNAプローブ) の使用下にノーザンブロット法を用いて全RNAの希釈系列を分析した。このために、その都度、細胞クローン9-13および8-1から単離された全RNA $8 \mu\text{g}$ 、 $4 \mu\text{g}$ または $2 \mu\text{g}$ を、ノーザンブロット法で公知量のプラス鎖またはマイナス鎖極性 (コントロールRNA) を有する類似のインビトロ転写と並行して分析し、かつ引き続きハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションは、完全NPT遺伝子およびHCV-IRESを覆うプラス鎖特異的なリボプローブ (上部の図版の「プラス鎖」) を用いるか、またはNS3配列に対して相補的なマイナス鎖特異的なRNAプローブ (下部の図版の「マイナス鎖」) を用いて実施した。矢印はレプリコンRNAの位置を標識している。この分析の結果は図2Bに記載されている。

【0096】プラス鎖の場合、約 10^8 コピー/全RNA μg が検出され、これは細胞あたり1000~5000のHCV-RNA分子に相当するが、その一方でマイナス鎖RNAの量は5~10倍低かった。この結果は、マイナス鎖RNAは、プラス鎖分子の合成のための装入物として使用される複製中間体もしくは中間コピーであるという仮定と一致する。

【0097】反応は実質的にウイルスRNAに依存したRNAポリメラーゼにより触媒されるので、HCV-RNAの合成は、DNA鋳型からのRNA合成を選択的に抑制するが、しかしRNA鋳型からのRNA合成を抑制しない抗生物質であるダクチノマイシンに対して耐性であるべきである。この推測を裏付けるために、 $[^3\text{H}]$ ウリジンをを用いて細胞をダクチノマイシンの存在下でインキュベーションし、放射性標識したRNAを抽出し、変性アガロースゲル電気泳動を用いて分離し、かつ $[^3\text{H}]$ 感光板の使用下に市販のバイオイメージャー (Bio-Imager) を用いて分析した。このためにその都度、クローン9-13および8-1の細胞約 5×10^6 をC i $[^3\text{H}]$ ウリジン 100μ を用いてダクチノマイシン (Dac t) の不在下 (-) または $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下 (+) に16時間インキュベーションした。この標識反応に引き続き、全RNAを調整し、かつホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動を用いて分析した。両方の第一のレーン中で、全RNAの1/10が表示されているのみである。放射性標識したRNAを、BAS-2500バイオイメージャー (フジ(Fuji)社) を用いて目視できるようにした。

【0098】この分析の結果は図2Cに記載されている。NS5Bポリメラーゼのインヒビタープロフィールとの一致において (Behrens et al., 1996, EMBOJ. 15,

12およびLohmann et al., 1997, J. Virol. 71, 841 6)、HCV RNAの複製はダクチノマイシンにより影響を受けることはないが、その一方で細胞RNAの合成は抑制された。ウイルスRNAの同一性を確認するために、複製した配列の再クローニングのためにRT-PCRを実施した。再クローニングしたRNAの配列分析は、クローン9-13中のRNAがHCV-特異的であり、かつHCV-構築物I₃₇₇/NS3-3'/wtの転写した転写物と一致することを示した。

【0099】ウイルスタンパク質の分析のために該当する細胞をまず代謝的に [³⁵S] メチオニン/システインを用いて放射性に標識し、引き続き溶解し、かつその後、免疫沈降を用いてHCV特異的なタンパク質を細胞-溶解産物から単離した。この分析の結果は図3Aに記載されている。その際、詳細には以下の通りに行った：細胞クローン9-13 (wt) および8-1 (Δ) の細胞を、当業者に公知であり、かつ市販のタンパク質標識混合物 (例えばNEN Life Science) を用いて16時間処理することにより代謝的に放射性標識した。非変性条件下 (例えばBartenschlager et al., 1995, J. Virol. 69, 7519による) または3つの異なった抗血清の使用下 (3/4, 5A, 5B、レーン1~12の上部の末端における標識による) に免疫沈降 (IP) を用いて、HCV特異タンパク質を細胞-溶解産物から分離した。トリシンSDS-PAGEを用いて免疫複合体を分析し、かつオートラジオグラフ法を用いて目視できるようにした。確定された大きさのマーカを得るために、相同レプリコン構築物I₃₇₇/NS3-3'/wtをワクシニアウイルスT7-ハイブリッド系を用いてHu h-7細胞中で一過性発現させた。その際に得られた生成物をサイズマーカー (レーン7~9) として、クローン9-13および8-1の細胞と並行して処理した。同定されたHCVタンパク質は、レーン1の左の端に標識されており、分子量 (キロダルトン) は、レーン9の右側の端に記載されている。使用されるNS3/4特異的な抗血清 (3/4') は、有利にはNS4AおよびNS4Bと反応し、これはNS3の下位表示 (Unterrepräsentation) につながることをわかる。

【0100】すべてのウイルス抗原は明確に検出可能であり、かつその見かけの分子量は、2シストロンのHCV-RNA-構築物の一過性発現により本来のHu h-7細胞中で確認された分子量に対する差異を示さなかった。ウイルス抗原の細胞内分布を決定するために、NS3およびNS5A特異的な抗血清の使用下に免疫蛍光法-検出反応を実施した (例えばBartenschlager et al., 1995, J. Virol. 69, 7519による)。このためにクローン9-13 (wt) および8-1 (Δ) の細胞を、播種の24時間後にメタノール/アセトンを用いてカバーガラス上に固定し、かつポリクローナルNS3またはNS5A特異的な抗血清とともにインキュベーションした。

結合した抗体を市販のFITC-共役した抗ウサギ抗血清を用いて目視できるようにした。非特異的な蛍光シグナルの抑制のために、細胞を色素「エバンスブルー (Evans Blue)」で色分けした。

【0101】この検出の結果は図3Bに記載されている。両方の抗血清を用いて細胞質中の強い蛍光を検出することができた。NS5A特異的な抗血清はさらに弱い細胞核の蛍光につながり、このことは、この抗原の少なくとも少量が細胞核にも達したことを暗示している。しかし細胞質中のウイルス抗原の一般に優勢な存在は、HCV-RNA複製が、多くのRNAウイルスの場合に該当するように、細胞質中で行われていることに関する著しい指標である。

【0102】これらの結果は、ここに記載されている試験バッチを用いてHCVのための細胞培養系の構築が成功しており、その効率はすべて従来公知のサイズのオーダーに勝っており、かつ通例の、かつ実証済みの生化学的方法で初めてウイルス性の核酸およびタンパク質の検出を可能にしたことを明らかに裏付けている。この効率は初めてHCVの発病学の完全に詳細な調査、種々のHCV-機能の発生学的分析およびウイルス-宿主細胞の相互作用の精密な研究を可能にし、このことにより抗ウイルス治療法の開発のための手がかりを定義することができる。

【0103】例3：HCVゲノム構築物を用いたHu h-7細胞のトランスフェクション

例2に記載したようにHu h-7細胞をトランスフェクションし、かつ選択したが、しかしその際、ここで完全なウイルスゲノムを有している選択可能な構築物を使用した。得られた細胞クローンを例2と同様にしてHCV-DNAの不在下にPCRを用いて調査し、かつその後、HCV-RNAの産生複製を、ダクチノマイシンの存在下にノーザンブロット、[³H] ウリジン標識、ウイルスタンパク質もしくは抗原の検出を用いて、有利にはウエスタンブロット、免疫沈降法または免疫蛍光法を用いて検出した。例2に記載されているバッチとは対照的に、ここに記載されている構築物を用いて、さらに完全で、かつ極めて感染力の高いウイルスが得られるが、これは該部位 (例2中) に記載されているサブゲノム構築物の場合、該当しない。細胞および細胞培養上清中に存在しているこれらのウイルスは、例えば超遠心分離、免疫沈降またはポリエチレングリコールを用いた沈殿により濃縮し、かつすべての外因性、つまりウイルス粒子中に構築されていない核酸を、ヌクレアーゼ (RNase、DNase、単球菌ヌクレアーゼ) を用いたインキュベーションにより消化する。このようにして、保護ウイルス粒子中に含有されていないすべての汚染性の核酸を除去することができる。保護されたウイルスRNAをヌクレアーゼのインキュベーション後に、例えばプロテイナーゼKを用いたインキュベーションを用いてSDS

含有緩衝液中でフェノールおよびフェノール/クロロホルムを用いた抽出により単離し、かつHCV特異的なプライマーの使用下にノーザンブロットまたはRT-PCRを用いて検出する。この試験バッチでも前記のHCVコンセンサスゲノムと選択マーカーとの組み合わせはウイルスRNA、ウイルスタンパク質ひいてはHCV粒子の効果的な生産にとって決定的である。

【0104】例4：耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-サブゲノム配列と結合しているHCV-RNA構築物の製造および適用

例1または例3によりHCV-RNA構築物を製造し、その際、抗生物質耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-RNA配列と結合している。このような構築物は、図7に図示されている。Hu h-7細胞は、例えば例2に記載されているように、これらのHCV-RNA構築物でトランスフェクションされている。細胞へのトランスフェクション後に、まず、相応する抗生物質を用いた選択を行う。その際に得られる細胞クローン中で、単一クローン性リボザイムが活性化されるか、またはリボザイムのための認識部位を有する構築物の場合、リボザイムが細胞中に導入される（例えばリボザイム構築物のトランスフェクションまたはその中で相応するリボザイムが使用されたウイルス発現ベクターを用いた感染による）。両方の場合においてリボザイム媒介された分解により耐性遺伝子はHCV-RNA配列から分離される。その結果は、HCV-ゲノム構築物の場合、耐性遺伝子を有していない確立されたHCV-ゲノムであり、これは確立された感染性ウイルス粒子の形成のための能力がある。HCV-サブゲノム構築物の場合、耐性遺伝子を有していないHCV-レプリコンが生じる。

【0105】例5：別々のルシフェラーゼトランスフェクション構築物を用いたHCV-RNA構築物の同時トランスフェクション

例1（A）または例3または例4によりHCV-RNA構築物を製造する。これと並行して、ルシフェラーゼ遺伝子を含むトランスフェクション構築物を製造し、その際、HCV-プロテアーゼ（例えばNS3-プロテアーゼ）分割部位に関してコードする第一のヌクレオチド配列を用いて、このルシフェラーゼ遺伝子と、その他のタンパク質またはその他のタンパク質の一部をコードする第二のヌクレオチド配列とが結合している。HCV-RNA構築物およびトランスフェクション構築物を、任意の宿主細胞、有利には肝癌細胞、特にHu h-7細胞に導入する。これは例2に記載の方法で行うことができる。改変されたルシフェラーゼ遺伝子の生成物は、その中でルシフェラーゼが外来成分との融合に基づいて不活性化するルシフェラーゼ融合タンパク質である。高いHCV複製を有するトランスフェクションし

た細胞中で、HCV-プロテアーゼのための切断部位を有する融合タンパク質を分離し、ひいては発光測定(luminometrische Messung)により決定することができるルシフェラーゼの活性型を遊離する。HCV-RNA構築物の複製を抑制すると、融合タンパク質は分離せず、かつ活性ルシフェラーゼは遊離しない。従って、ルシフェラーゼの定量的な測定はHCV-サブゲノム構築物の複製のための尺度である。ルシフェラーゼ遺伝子の代わりに、同様に修飾されているその他のリポーター遺伝子も同様に使用することができるので、このリポーター遺伝子がHCV-サブゲノム構築物の成分ではなくても、その発現はウイルス複製に依存する。HCV-タンパク質または核酸により不活性化または活性化される細胞タンパク質もまたいわゆる代理マーカー(Surrogat marker)として使用することができる。この場合、この代理マーカーの発現もしくは活性化は、ウイルスDNAの複製のための尺度である。

【0106】例6：遺伝子治療のために肝癌細胞特異的な遺伝子輸送体として使用するための導入された外来遺伝子を有するHCV-サブゲノム構築物の製造

この組み換え型および選択可能なHCV-サブゲノム構築物を、トランス相補性ヘルパー細胞系、つまり誘発可能な、または構造的に欠けている機能を発現する細胞系（例えば構造タンパク質）にトランスフェクションする。機能的なHCV-サブゲノム構築物を有する細胞クローンを相応する選択により確立することができる。宿主細胞により発現したウイルス構造タンパク質は、その中へHCV-サブゲノム構築物のRNAを導入するウイルス粒子の形成を可能にする。その結果はつまり単一クローンした外来遺伝子も含めて本発明によるHCV-サブゲノム構築物を含有し、かつこれを感染によりその他の細胞に移すことができるウイル様粒子である。このような構築物の例は図8に記載されている。ここに記載した、組み込まれた外来遺伝子を有する本発明によるHCV-サブゲノム構築物を直接発現ベクターとして使用する可能性もまた生じる。その場合、前記の方法と同様に行うが、しかしトランス相補性の因子を発現する細胞系をトランスフェクションすることが異なっている。この場合、HCV構築物は単に発現ベクターとして使用されるのみである。

【0107】例7：細胞培養に適合したHCV-RNA構築物の製造

(A) 単離法

適合した突然変異の測定および細胞培養に適合したHCV-RNA構築物の製造のために、以下の通りに行った：細胞をHCV-RNA構築物を用いて例1および2に記載されているようにトランスフェクションし、かつG418耐性細胞クローンを製造した。複製能力（これはこの関連において、トランスフェクションしたHCV-RNAもしくはHCV-RNA構築物1 μg

あたりに得られるG418-耐性細胞クローンの数と解
釈する)の測定のために模範的に9-13(図1B、レ
ーン11)と称する細胞クローンの1つからの全RNA
を単離し、かつその中に含有されているHCV-RNA
の量を図2Bに記載されているようにノーザンブロッ
トを用いて測定した。引き続き、HCV-RNAを約10⁹
分子含有している全RNAの10μgをエレクトロポ
レーションによりナイーヴHu h-7細胞に導入した

(図9)。これと並行してナイーヴHu h-7細胞から
単離した全RNAを用いて10μgの全RNA量に満た
した類似のneo-HCV-RNAのインビトロ転写10⁹
を、ナイーヴHu h-7細胞にトランスフェクショ
ンした。G418を用いた選択後に、両方のパッチ中の
細胞コロニーの数を測定し、これをRNAμgあたりの
コロニー形成単位(colony forming units(cfu))で表し
た。選択媒体中、G418 500μg/mlの濃度の
場合、単離した全RNA中に含有されているHCV-R
NAにより得られたコロニーの数はHCV-RNAμg
あたり約10000cfuであった。これに対してイン
ビトロ転写された同量のHCV-RNAを用いてわず
か30~50コロニーが得られたのみであった。この結
果は、細胞コロニーから単離されたHCV-RNAの特
異的な感染力が、類似のインビトロ転写の感染力よりも
約1000~10000倍高いことを証明している。方
法論的プロセスは図9に記載されている。

【0108】「長距離RT-PCR(long-distance RT-
PCR)」を用いて、9-13細胞の全RNAからのHCV
-RNAを増幅し、PCR増幅物をクローニングし、
かつ数多くのクローンを配列決定した。この再クロー
ニングしたRNAの配列と、本来ナイーヴHu h-7細胞
に導入されたRNAの配列との比較は、再クローニン
グしたRNAが全HCV配列にわたって分布している数
多くのアミノ酸交換を占有していることを明らかにした
(図10)。この再クローニングした突然変異体のSfi
I-断片を、本来のレプリコン構築物の類似のSfi
I-断片との交換でこの中に導入し、かつそれぞれの突
然変異体のRNAをナイーヴHu h-7細胞に導入し
た。次いでG418を用いた選択後に、それぞれのHC
V-RNA-突然変異体に関して形成されたコロニーの
数を測定した。出発RNAではRNAμgあたりわずか
30~50のコロニーが得られたのみであったが、再ク
ローニングした変異体の2つの場合にはコロニー数が明
らかなり高かった(図10)。HCV-RNA-構築
物9-13Iおよび9-13Cの場合、特異的感染力は
RNAμgあたり100~1000cfuであり、かつ
9-13Fレプリコンの場合、それどころかRNAμg
あたり1000~10000であった。この結果は、突
然変異体9-13I、9-13Cおよび特に9-13F
が複製能力の明らかな上昇につながることを示してい
る。これに対してすべてのその他のHCV-RNA-構

築物(9-13A、B、G、HおよびK)は、もはや複
製能力がなく、従って致命的な突然変異を有していた。

【0109】9-13F-構築物中のアミノ酸交換のい
ずれが複製の増加につながるかという問いへの回答のた
めに、交換を単独で、または組み合わせて出発-HCV
-RNA-構築物に導入し、かつ相応するRNAをナイ
ーヴHu h-7細胞に導入する。これらのRNAを用い
たトランスフェクションの結果は、第1表にまとめられ
ている。ここから本実施例では高い複製能力が複数の突
然変異により制限されていることが明らかである。HC
V-RNA-断片NS5AおよびNS4B中のアミノ酸
交換が大いに貢献している。NS3-領域における個々
の交換もまた、おそらくこの個別交換の相助作用に基づ
いて貢献している。この調査は、neo-HCV-RN
A-構築物でトランスフェクションされた細胞のG41
8-選択により、明らかに高い複製能力を有するH
CV-RNAを富化した。ここに記載された試験パッチ
を用いて極めて異なった複製効率を有するHCV-RN
A-構築物を選択することができる。その中/上でHC
V-RNA-構築物含有細胞が選択のために培養される
選択媒体中の抗生物質濃度が高いほど、細胞が成長する
ことができるためには適応突然変異の程度、ひいては該
当するHCV-RNA-構築物中での複製効率は高くな
くはならない。低い抗生物質濃度での選択を実施する
と、よりわずかな適合突然変異およびよりわずかな高い
複製効率を有する細胞もまた生き残り、かつ増殖するこ
とができる。

【0110】複数の適合突然変異を有する従来記載され
ていたHCV-RNA-構築物9-13Fは、疑う余地
なく親HCV-RNAより高い複製効率を有していた。
さらに高い複製を有するHCV-RNAを細胞培養中で
得るために、選択された細胞クローンの全RNA中に含
有されていたHCV-RNAを数回、ナイーヴHu h-
7細胞中で継代した。この選択された細胞クローンは、
5-15と呼ばれ、HCV-RNA-構築物I₃₈₈/N
S3-3'を用いたトランスフェクションにより得られ
る(図1)。これは十分に、22のヌクレオチドの分だ
け短いHCV-IRESを有するHCV-RNA-構築
物を用いたトランスフェクションにより製造された細胞
クローン9-13に相当する(I₃₇₇/NS3-3'、
図1)。細胞クローン5-15から単離された全RNA
10μgを、エレクトロポレーションを用いてナイーヴ
Hu h-7細胞に導入し、かつG418 1mg/ml
を用いて細胞を選択した。このようにして得られた細胞
クローンから、再度、全RNAを単離し、ナイーヴHu
h-N7細胞中にトランスフェクションし、かつ同様に
して選択した。この工程を合計して4回繰り返した。4
回目の継代の後で、細胞クローンから全RNAを単離
し、かつ「長距離RT-PCR」を用いてneo-HC
V-RNAを増幅した。増幅したDNA断片を制限酵

素S f i Iで消化し、かつS f i I制限された出発構築物I₃₈₉ /NS3-3'に挿入した。合計して100を越えるDNAクローンが得られ、かつまず制限消化を用いて分析した。インビトロで転写した約80のこれらのクローンのRNAをその都度ナイーヴHu h-7に導入し、かつG418 500mg/mlを用いて選択した。調査した80のneo-HCV-RNA-変異体から、大部分が複製欠陥であることが判明した。しかし5.1および19と呼ばれる2つの突然変異体の場合、RNAマイクログラムあたりの「コロニー形成単位」と呼ばれる特異的な感染力は、極めて明らかに増大した(第2表)。細胞培養中でのRNAの複数回の継代により、明らかに、その複製効率が、複数のサイズオーダーの突然変異(いわゆる「適合突然変異」)に基づいて本来患者からクローンしたRNAのものよりも高いHCV-RNAを製造することができる。

【0111】(B) 改変方法。

【0112】(A)により製造し、かつ同定された適合突然変異を、わずかに複製能力のあるHCV-RNA-構築物中に移すことができ、かつこの構築物の複製の著しい向上につながる。この向上は極めて高いので、これにより明白に、選択可能なマーカー遺伝子をもはや有していないHCV-RNAを細胞培養中で複製することができる。図12は、HCV-RNAの複製効率の比較を示しており、これは出発配列または適応配列9-13Fもしくは5.1に相応していた。容易な測定のために、neo-遺伝子を除き、かつルシフェラーゼのための遺伝子により交換した。ネガティブコントロールとして、再び、NS5B RNA-ポリメラーゼの不活性化突然変異に基づいて複製欠陥のあるHCV-RNA-構築物を使用した。トランスフェクションの24時間後にすでに、欠損RNAと9-13Fもしくは5.1-構築物の間のルシフェラーゼ活性における明らかな違いが認識される一方で、欠損RNA(318DN)と、適合突然変異を有していない出発-RNA-構築物(wt)との間にはほとんど違いを見ることはできない。全観察時間の間、最も高いルシフェラーゼ活性ひいては最も高い5.1-RNAを有する複製が得られた。この調査は、このRNAの高い複製効率を証明するのみではなく、適応HCV-RNA-構築物を用いて、そのために選択可能な遺伝子の存在がもはや必要ではない細胞培養系を構築することが可能であることもまた示している。出発構築物と、突然変異体9-13F、5.1および19の間のヌクレオチドおよびアミノ酸の違いの包括的な概要は、第3表に示されている。

【0113】例8：細胞培養に適合したHCV-RNA-全長ゲノムの製造

例1~7では常に、p7もしくはNS2までを含むコアの全構造タンパク質領域が欠けているサブゲノムのHCV-RNAを使用した。この例8では、適合したNS3

-5B-配列を用いて細胞培養中のHCV-全長ゲノムを複製することが可能であることを示している。この目的のために、まず例7に従って製造され、高度に適合したHCV-RNA 5.1のS f i I-断片を、選択可能なHCV-全長ゲノムにトランスフェクションした(図12)。このHCV-ゲノムをナイーヴHu h-7細胞にトランスフェクションし、かつ異なったG418-濃度で選択した。(G418濃度の)選択強度に依存して、異なった大きさの細胞クローンの数が得られた(図12B)。これと比較して、適合突然変異を受けなかった未変化のHCV-全長ゲノムではクローンは得られず、またNS5B RNA-ポリメラーゼにおける不活性化突然変異に基づいて複製欠陥のあるネガティブコントロールでも同様であった。生じた細胞クローンが実際に自律的に複製するHCV-全長構築物を有していることに対する証明のために、全RNAを複数の細胞クローンから単離し、かつノーザンブロットを用いて分析した。すべての細胞クローンにおいてHCV-全長RNAは明確に検出可能であった(図12)。これにより細胞培養に適合したHCV-配列を用いて、高い効率で、および自律的に細胞系で複製するHCV-全長ゲノムを製造することができる、つまり本発明による系を用いて適合したHCV-全長ゲノムを製造することが可能であることが明確に証明される。さらにこのクローンは、完全なHCV-配列、つまりウイルス粒子の形成のために必要な構造タンパク質もまた有しているので、この系を用いて大量の感染ウイルス粒子を細胞培養中で製造することが可能である。これらのウイルスの検出のために、細胞不含で、複製HCV-全長ゲノムを有する細胞の上清をナイーヴHu h-7細胞に添加し、かつこうして感染させた細胞をG418で選択する。前記の条件下で成長するそれぞれの細胞クローンは、感染した細胞に起因する。しかし複製するHCV-全長ゲノムを有する細胞の細胞培養上清中のウイルスは、従来技術で公知の種々の方法、例えば超遠心分離またはマイクロ透析(Mikrodialyse)で富化し、かつ生成し、かつ次いでナイーヴ細胞の感染のために使用することができる。この方法で、本発明によるHCV-細胞培養系を用いて、細胞中で高い効率で複製し、かつ感染性のウイルスを産出する細胞培養に適合したHCV-全長ゲノムを製造することができることが明確に示されている。これらは同様に試験動物、有利にはチンパンジーの感染により検出することができる。

【0114】例9：リポーター遺伝子を有するHCV-全長-構築物およびHCV-サブゲノム-構築物の製造
HCV-RNA-構築物を製造したが、その際、抗生物質耐性遺伝子の代わりにリポーター遺伝子を挿入する(図13)。その際、リポーター遺伝子もしくはリポーター遺伝子産物の量もしくは活性に基づいて複製を決定することができる。リポーター遺伝子は、有利にはルシ

フェラーゼ遺伝子の群、CAT-遺伝子（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ-遺伝子）、lacZ-遺伝子（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、GFP-遺伝子（緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein) 遺伝子）、GUS-遺伝子（グルクロニダーゼ遺伝子）またはSEAP-遺伝子（分泌された (sezer nierte) アルカリ性ホスファターゼ遺伝子）からの遺伝子である。これらのリポーター遺伝子もしくはこれらの産物、つまり相応するリポータータンパク質を、例えば 10 蛍光法、化学発光法、比色法により、または免疫学的方法（例えば固相酵素免疫測定法、ELISA）を用いて測定することができる。リポーター遺伝子は、固有のIRESにより発現させるか、またはそのままで活性であるか、もしくはタンパク質分解により分解可能なアミノ酸配列によりHCV-タンパク質と結合している融合タンパク質の形で発現させることができるので、これは細胞性またはウイルス性（HCV）プロテアーゼによりタンパク質から分離される。

【0115】例10：遺伝子治療のための肝細胞特異的な遺伝子輸送体としてまたは発現ベクターとしての使用 20 のための導入された外来遺伝子を有するHCV-全長-構築物の製造

構築物（図14）を細胞内に導入し、かつここでその他の細胞の感染のために使用することができるHCV-ウイルス粒子を形成させる。ウイルス粒子は外来遺伝子を有するRNAを包んでいてもよいので、この外来遺伝子によりコードされたタンパク質の産生のためにこのよう*

第1表：9-13F突然変異体において発見され、かつ親HCV-RNA-構築物 1389/NS3-3'/wtに導入された適応突然変異を用いたHCV-RNA-構築物の特異的な感染性 (cfu/ μ g RNA)

アミノ酸交換 ¹	HCV-タンパク質	cfu/ μ g RNA ²
なし		30 ~ 60
1283 arg -> gly	NS3	200 ~ 250
1383 glu -> ala	NS3	30 ~ 60
1577 lys -> arg	NS3	30 ~ 60
1609 lys -> glu	NS3	160 ~ 300
(1283 arg -> gly + 1383 glu -> ala + 1577 lys -> arg + 1609 lys -> glu)	NS3	360 ~ 420
1936 pro -> ser	NS4B	500 ~ 1000
2163 glu -> gly	NS5A	1000 ~ 5000
2330 lys -> glu	NS5A	30 ~ 60
2442 ile -> val	NS5B	30 ~ 60
合計		5000

¹ HCV-単離物 Con-1 (EMBL-Genbank No. AJ238799) のポリタンパク質中のアミノ酸交換
アミノ酸は3文字のコードで記載されている

² G418 500 μ g/ml の選択の際のコロニー形成単位（細胞コロニーの数）

* にして感染させた細胞中で外来遺伝子を使用することが
できる。構築物でトランスフェクションされた細胞は、
同様に外来遺伝子を発現する。

【0116】例11：耐性遺伝子産出がHCV-割合を
有する融合タンパク質として発現する単シストロンのH
CV-RNA-構築物の製造

特定の調査にとって、HCV-RNA-構築物が異種 I
RES-エレメントを有していない場合には有利であ
る。このような調査は例えばインターフェロン耐性の決
定である。HCV-RNA-構築物を有する細胞をイン
ターフェロン- α またはインターフェロン- β を用いて
インキュベーションすると、これはHCV-RNAの複
製の減少につながる。作用機構の解明のために、HCV
-RNA-構築物が異種 IRESを有していないことが
必要である。というのもさもないとインターフェロン媒
介された抑制がHCV-複製の抑制により媒介されるの
か、または異種 IRESの抑制により媒介されるのか決
定することができないからである。従って、耐性遺伝子
がHCV-タンパク質と融合する構築物を製造する。

（図15）。融合タンパク質がそのままで活性である
か、または細胞性またはウイルス性（HCV-）プロテ
アーゼによりここから分離するように耐性遺伝子産物が
タンパク質分解により分解可能なアミノ酸配列によりH
CV-タンパク質と結合している。

【0117】

【表1】

【0118】

* * 【表2】

第2表：親HCV-RNA-構築物1389/NS3-3'/wtおよび
変異体9-13C、9-13I、9-13F、5.1および19の
特異的感染性 (cfu/μg RNA)

トランスフェクションしたRNA-変異体	cfu/μg RNA ¹
野生型	30 ~ 50
9-13 C	100 ~ 1,000
9-13 I	100 ~ 1,000
9-13 F	1,000 ~ 10,000
5.1	50,000 ~ 100,000
19	50,000 ~ 100,000

¹ G418 500μg/mlの選択の際のコロニー形成単位（細胞コロニーの数）

【0119】

【表3】

第3表：親HCV-RNA-構築物1389/NS3-3'/wtおよび
突然変異体9-13I、9-13F、5.1および19の間の
ヌクレオチドおよびアミノ酸の相違

HCV 突然変異体	ヌクレオチド位置	ヌクレオチド交換	アミノ酸交換
9-13 I	3685	C > T	Pro > Leu
	4933	C > T	Thr > Met
	5249	T > C	-
	8486	C > T	-
	8821	G > A	Trp > stop
	8991	C > G	Arg > Gly
	9203	A > G	-
	9313	T > C	Phe > Ser
	9346	T > C	Val > Ala
9-13 F	3866	C > T	-
	4188	A > G	Arg > Gly
	4489	A > C	Glu > Ala
	4562	G > A	-
	4983	T > C	-
	5071	A > G	Lys > Arg
	5166	A > G	Lys > Glu
	6147	C > T	Pro > Ser
	6829	A > G	Glu > Gly
	7329	A > G	Lys > Glu
	7664	A > G	Ile > Val
	8486	C > T	-
	8991	C > G	Arg > Gly
NK5.1	4180	C > T	Thr > Ile
	4679	C > T	-

	4682	T > C	-
	5610	C > A	Leu > Ile
	6437	A > G	-
	6666	A > G	Asn > Asp
	6842	C > T	-
	6926	C > T	-
	6930	T > C	Ser > Pro
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
NK19	3946	A > G	Glu > Gly
	4078	C > G	Ala > Gly
	4180	C > T	Thr > Ile
	4682	T > C	-
	5610	C > A	Leu > Ile
	5958	A > T	Met > Leu
	6170	T > A	-
	6596	G > A	-
	6598	C > G	Ala > Gly
	6833	C > T	-
	6842	C > T	-
	6930	T > C	Ser > Pro
	7141	A > G	Glu > Gly
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
	7735	G > A	Ser > Asn

【0121】記載は、出発-HCV-RNA-配列Con1 (EMBL-遺伝子バンク (Genbank) No. AJ238799) および細胞培養に適合したHCV-RNAの配列との間のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の

違いである。数はHCV-単離物Con1のヌクレオチド位置およびアミノ酸位置に関する。

【0122】

【外3】

<110> Bartenschlager, Ralf

<120> Hepatitis C Virus cell culture system

<130> ba-1

<140> 199 15 178.4

<141> 1999-04-03

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11076

<212> DNA

<213> Hepatitis C Virus

<400> 1

```

gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tctttcacgca gaaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaaccgt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgacgggg tcccttcttg gatcaaccgg ctcaatgccc ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccagata gtgttgggtc gcgaaggccc ttgtgttact gctgatagg 300
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgugcacg aatccclaac 360
ctcaagaaaa aaccaaactt aacacaaacg ggcgcgcgat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctatlugg clalgaclug gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcage gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgaactgtcc ggtgccccta atgaactgca ggaaggagca gcgcggttat 600
cgtgtgtggc cagcaggggc gttccttgcg cagctgtgct cgaactgttc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg gcggaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcacttgg 720
ctcctgcaga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgag gggctgcgat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccagcgga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tctgtcgac caggatgato tggaagagga gcacagggg ctcgcgcag 900
ccgaactgtt cgcagggctc aagggcgcga tgcgcgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgcgg aatatcatgg tggaaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctggglglg cgggacggct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgttctct cgtgctttac ggtatogccg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gcttctata gcttcttga cgaattcttc tgagttttaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccacctatc tgcctctctt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcatcc ctgagggcct tccctctct gccaaaggaa tgcaggtctt gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttctctt ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaacctt 1500
tgcagggcgc ggaaccccc ccttgccgac aggtgctctt gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg ggaacaaacc cagtgcaacg ttgaggttg gatagttgtg 1620
gaaagagtha aatggctctc ctcaagctga tcaacaagg ggtgaagga tgcacagaag 1680
gtaccccatc gtaaggatc tgaatgggg cctcgttgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaactcta ggcceccgga accacgggga cgtgttttct ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatgggcac gaactctaaa cctcaagaa aaaccaaacg taacacaaac 1860
cgcgcgccac aggaagtcac gttcccgggc ggtggtcaga lcgtaggttg aqlltacctg 1920
ttgcgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggtcg 1980
caactctgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggtctgac agccgaggg tagggcctgg 2040
gctcagcccg ggtaccccc qccctctctat ggcaatgagg gcttggggtg ggcaggatgg 2100
ctcctgtcac cccgtggctc tggcctagt tgggccccca cggacccccg gcgtaggtcg 2160
cgcaatttgg gtaaggctat cgataccctc acgtcgggtc tcgccgatct catgggttac 2220
attcctctcg tggcgcccc cctaggggyc gctgacagg cctgagcga tggcggtccg 2280
gttcttgagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaaatctg ccggttctct ctttctctat 2340
ttccttttgg ctttgcgtgc ctgtttgacc atccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgaacctgt caccgaagac tgcctcaacg caagcaatgt gtaagagga 2460
gcggacatga tcatgcata ccccggtgc gtgcctgcg ttccggagaa caactctctc 2520
cgctgctggg tagcgtcac tcccaagctc ggggcaggga acgtagagt cccactaacg 2580
acgatacagc gccatgtcga tttgtctgtt ggggcgggtg ctctctgtct cgtatutac 2640
gtggggagac tctgaggata gttttctct gtcgcccagc tgttcaactt ctgcctctgc 2700

```

【0123】

【外4】

40 【外5】

57

acgctgcacg ggccaaacgc cctgclglal agcctgggag ccgttcaaaa cgaggttact 6720
 accacacacc ccataaccaa atacatcatg gcacgcacgt cggctgacct ggaggtcgtc 6780
 acgagacacel yyytgcctgt agcggagto ctacagatgc tggccgcgta ttgctcgaca 6840
 acaggcagcg tggctattgt gggcaggato atcttgcctg gaaagccggc calcalluoc 6900
 gacaggggaag tcccttaccg ggagttcgat gagatggaaq agtgcgcctc acactccct 6960
 tacatcgaaac agggaaigca gctcgccgaa caallcaaac agaaggcaat cgggttgcgt 7020
 caaacagcca ccaagcaagc ggaggtcgtc gctcccgctg tggaaatccaa gtggcggacc 7080
 clgaagacct tctggggcaa gcatactgtg aatttcata gcgggataca atatctaga 7140
 ggcttgcctc ctctgcctgg caaccccgag atagcaatca tgatggcaat cacagcctct 7200
 atcaacagcc cgcctaccac ccaacatacc ctctgttta acatcctggg gggatgggtg 7260
 gccgcccaac ttgtctctcc cagcgctgct cltgccltgc taggcgcggg catcgctgga 7320
 cgggtctgtg gcagcatagg ccttgggaag gtgcttgcgt atatttttggc aggttatgga 7380
 gcaggggtgg caggcgcgct cgtggccllt aaggtcaiga gggcgagat gccctccacc 7440
 gaggacctgg ttaacctact cctgtctatc ctctccctg gcgcctagt cgtcggggtc 7500
 gtgtgcgcag cgatactgcg toggcaacgt gggccagggg agggggcgtg gcagtggatg 7560
 aacgggtgta tagcgttgcg ttccgggggt aaccacgtct ccccccacga ctatgtgcct 7620
 gagagcgacg ctgcagcagc tgcactcagc atctctctca gtcttaccat cactcagctg 7680
 clgaagaggg ltcacagctg galcaacgag gaactgctca cgcctatgct cggctcgtgg 7740
 ctaagagatg tttgggattg gatagcacg gtgttgactg attcaagac ctggctccag 7800
 tccagctccc tgcggcgatl gccgggagtc ccttctctct catgtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagtctggc gggcgacgg calcatgcaa accacotgcc catgtggagc acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaacggctc catgaggatc gtggggccta ggacctgtag taacacgtgg 7980
 catggaaacat tcccatataa cgggtacacc aggggocctc gcaagccctc cccggcgcca 8040
 aattattcta gggcgctgtg gcgggtggct gctgaggagt acgtggaggt tacggcggtg 8100
 ggggtatttc actacgtgac gggcatgacc actgacacgc taaagtgcgc gtgtaaggtt 8160
 cgggcccccg aattcttacc agaaglggat gggglgcggl tgcacaggta cgcctccagc 8220
 tgcacacccc tcttacggga ggaggtcaca ttctgttgcg ggtcaatca atacctggtt 8280
 gggctcacgc tccatgcga gccgaacgc gacgtacagc tgcctacttc catgctacc 8340
 gacccctccc acattacggc ggagacggct aagcglaggc lggccagggg atctccccc 8400
 tccctggcca gctcatcagc tagcagcgtc tctgcgcctt ccttgaaggc aacatgcact 8460
 accgtctatg aclocccgag cgtgacotc atcgaggca acctcctgtg gcggcaggag 8520
 atgggcggga acatcaccgc cgtggagtca gaaaataagg tagtaatttt ggactcttcc 8580
 gagccgclcc aagcggagga ggaatgagag gaagtatccg ttccggcgga gatcctgcg 8640
 aggtccagga aattccctcg agcgtgccc atatgggac gccgggatta caaccccca 8700
 ctgltagatg cctggaagga cccggactac gtccctccag tggatcacgg gtgtccattg 8760
 ccgctgcca aggcctctcc gataccacct ccacggagga agaggacgtt tgtcctgtca 8820
 gaatctacgc tgtctcttgc cttggcgagg ctogccaaa agacotcggc cagctccgaa 8880
 tctgcggccg tgcacagcgg cccggcaacg gctctctctg accagccctc cgcagcggc 8940
 gacgcgggat ccgacgttga gtctactccc tccatgcctc cctttagggg gggcgggg 9000
 gactccgatc tcaagcagcg gtcttggctc accgtaaagg aggaggttag tgaggacgtc 9060
 glclgctgct cgatgtccta cacatggaca ggcgcctga tcaagccatg cgttgcggag 9120
 gaacacagc tgcctatcaa tgcaactgagc aactcttgc tccgtaccca caacttggtc 9180
 tatgtacaaa catctgcag ccgaagcctg ccgcagagga aggttacctt tgacagactg 9240
 caggtctctg accgaccata ccgggacgtg ctcaaggaga tgaaggcgaa ggcgtccaca 9300
 gtaaggtca aacttctatc cgtggaggaa gcctgtaagc tgacgcccc acattcgcc 9360
 agatctaaat ttggctatgg ggcacaggac gtcgggaacc tatccagcaa ggcgttacc 9420
 cacatccgct ccgtgtggaa ggacttgcgt gaagacactg agacaccaat tcacaccacc 9480
 atcatggcaa aaaaagaggl lltctgcgtc caaccagaga agggggggcg caagccagct 9540
 cgccttacc tatccacaga tttgggggtt cgtgtgtgcg agaaaatggc cctttacgat 9600
 gtggclccca cctccctca ggccgtgatg ggctctctat acggattcca atactctct 9660
 ggacagcggg tccagttctc ggtgaatgcc tggaaagcga agaaatgcgc tatgggcttc 9720
 gcatacgaca cccgtgtttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttggagg 9780
 tcaatctacc aatgttliga cltggccccc gaagccagac aggcataag gtgcctcaca 9840
 gagcggtctt acatccgggg cccctgaact aattctaaa ggcagaaact cgcctatcgc 9900
 cgggtcccgct cgagcgggtg actgacgacc agclgggla alaccctcac atgttacttg 9960
 aaggccgctg cggcclgtcg agctgtgaag cccagagact gcacgatgt cgtatgcga 10020
 gacgaccltg tggttatctg tgaagcgcg ggaacccaag aggaagaggc gagcctaagg 10080
 gccctacagg aggtatgac tagatactct gccccctg gggacccgac caaaccagaa 10140
 tagacttgg agthgataac atcatgtccc tccaatgtgt cagtcgcgca cgtatgcact 10200
 ggcaaaagg lglactlact cccacacccc cccctgcggg gcttgcgtgg 10260
 gacacagcta gacacactcc agtcaattcc tggctaggca acatcatcat gtatgcgccc 10320
 aucltlygg caaggaagat cctgatgact catctctctt ccatcctctt agctcaggaa 10380
 caacttgaaz aagccctaga ttgtcagatc tacggggcct gttactccat tgagccactt 10440
 gacclacclc agatcaatca adgactccat ggctttagcg caltttcaact ccatagttac 10500
 tcccaaggct agatcaatag ggtggcllca lgcclcagga aactlgggyl accgccttg 10560
 cgaclctgaa gacatcgggc cagaagtgtc cgcgtaggc tactgtccca gggggggagg 10620

58

* * 【外6】

gctgcacttt gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 10680
 ccaatccggg ctgcgtccca gttggattta tccagctggg tegtgtgtgg ttacagcggg 10740
 ggagacatat atcacagcct gtctcgtgcc cgaccccgct ggttcatgtg tgcctactc 10800
 ctactttctg taggggtagg catctatcta ctcccaacc gatgaacggg gagctaaaca 10860
 ctccaggcca ataggccatc ctgttttttt cctctttttt tttctctttt tttttttttt 10920
 tttttttttt tttttttttt tctctttttt ttctcttttt ttctcttttt ttctcttttt 10980
 tggctccatc ttagccctag tcaaggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 11040
 agagagtgtc gataactggc tctctgcaga tcaagt 11076

【0126】

【外7】

<210> 2
 <211> 8637
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 2
 gccagccccc gatlgggggg gacactccac catagatcac tccccctgtga ggaactactg 60
 tctttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaaccgt gagtacaccg gaattgcacg 180
 gacgaccggg tcttttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcga gtccccggg aggtctctga gaccgtgcac catgagcagc aatcctaac 360
 ctcaaaagaa aaccaaaggg cgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
 cggccgcttg gtlggagagg ctattcggct atgactyggc acaacagaca atcggctgct 480
 ctgatgcggc cgtgttcagg ctgtcagcgc agggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 540
 acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 600
 ogacggcgct tcttgcgca gctgtgctcg acgttjtcac tgaagcggga agggactggc 660
 lyctatttgg cgaagtgcgg gggcaggatc tctgtctate tcaacttgcct cctgcggaga 720
 aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 780
 cattcgacca ccaagcgaaa catcgctcgc agcgagcagc tactcggatg gaagccggcg 840
 tlgtcgtatga ggaatgatct gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttgc 900
 ccaggctcaa ggccgcgatg ccgcacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 960
 gcttcggcaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac tgtggcggcg 1020
 tgggtgtggc ggaacgclat caggacatag cgttgcgtac cctgatatt gctgaagagc 1080
 ttggcgcgga atgggtgac cgttctctcg lyctttacgg tatcgccgct cccgatccgc 1140
 agcgcctcgc ctctatcgc cttcttgac agttcttctg agtttaaca gaccacaacg 1200
 gtttccctct agcgggatca attccgcccc totcctctcc cccccctaa cgttactggc 1260
 cgaagccgct cgggaataagg ccggtgtgcg ttgtctata tgttattttc caccatattg 1320
 ccgtcttttg gcaatgtgag ggcgcggaaa cctggccctg tcttcttgac gacattctc 1380
 aggggtctct cccctctcgc caaaggnaatg caaggtctgt tgaatgtcgt gaaggaagca 1440
 gttctctcgg aagcttcttg aagacaaaac acgtctgtag cgaccccttg caggcagcgg 1500
 aacccccac ctggcgacag glgctctcgc ggccaaaagc cacgtgtata agatacacct 1560
 gcaaaaggcgg cacaaccccc gtgccacgtt gtgagttgga taqttgtgga aagagtcaaa 1620
 tggctctcct caagcgtatt ctgaaggatg ctgaaggatg ccagaagggt accccattgt 1680
 atgggatctg atctggggcc tcgtgtgcac tgcctttacat gtgttttagtc gaggttaaaa 1740
 aacgtctagg ccccccgaa cccggggagc tggttttcct ttgaaaaaca cgtataatcc 1800
 atggaccggg agatggcagc atcgtgcgga ggcgcgggtt togtaggtct gatactcttg 1860
 acctgtgcac cgcactata gctgttctct gctaggctca tatggtgglt acaatatttt 1920
 atcaaccagg ccgaggcaca cttgcaagtg tggatccccc cectcaacgt tcggggggggc 1980
 cgcatgccc tcatctctct caogtgcgg atccaccacg agctaatctt taccatcac 2040
 aaaaactctg cgcacatact cgttccactc cgtgtgcctc ogltcatgca tgcctgtgcg gaaggttgct 2100
 ccgtactctc tgcgcgcaca cgggtctcatt cglcatgca tgcctgtgcg gaaggttgct 2160
 ggggggtcatt atgtccaaat ggctctcatg aagttggccg cactgacagg taogtacgtt 2220
 tatgaccatc tcaacccact ggcgggactg gcccaacggg gcctacagaga ccttgcggtg 2280
 gcagttgagc ccgtctctct ctctgatatg gagacaaagg tlatcacctg gggggcagac 2340
 accgcggcgt gtggggacat catcttgggc ctgcccgctc ccgcccgag ggggaggag 2400
 atacatctgg gaccggcaga cagccttgaa gggcaggggg ggcgaactct cgcgcctatt 2460
 acggcctact cccaacagac gcgaggccta cttggctgca tcatcactag cctcacaggc 2520
 cgggacagga accaggtcga gggggaggtc caagtgtctc ccaccgcaac acaatctttc 2580
 ctggcgacct gcgtcaatgg cgtgtgttgg actgtctate atggtgcggg ctcaagacc 2640
 cttgcccggc caaaggggcc aalcaaccaa atgtacacca atgtggacca ggaactcgtc 2700
 ggcggcagg cgcgcccggt ggcccggttc ttgaacacat gcaactgcgg gcactgcagg 2760
 ctttacttgg tcaagaggca lgcgatgtc attccgggtg gccggcgggg cgacagcagg 2820
 gggagcctac tctcccccag gcccgctctc tacttgaagg gctcttcggg cgtcttcagg 2880
 ctctgcctct cggggcagc tgtgggcata cttcgggcty ccgtgtgcac ccgaggggtt 2940
 gegaaggcgg tggactttgt aaccgtcgag tctatggaaa ccaatatgag gtcctccggtc 3000
 ttcaaggaca actcgtcccc tccggcgcta ccgcagacat tccaggtggc ccatctacac 3060
 gccctactg gtagcggcaa gacaulaag gtgcgggtg cgtatgcagg ccaagggtat 3120
 aaggtgcttg tctgaaccc gtccgtcgcc gccacocctag gtttcggggc ghatatgtct 3180
 aaggcacatg gtatcgaccc taacatcaga accggggtaa ggaccatcac cacgggtgcc 3240
 cccatcacgt actccacct tggcaagttt cttgcgcagc gtggttgcct tggggggccc 3300
 tatgacatca taatatgtga tgagtgcac tcaactgact cgaccactat cctgggcact 3360
 ggcaacgtcc tggaccaagc ggagcggcl ggaagcgagc togtcgtgct cgcacccgt 3420
 acgcclccgg gatcggtcac cgtgccacat ccaaacatcg agggagtgcc tctgttcagg 3480
 actggagaaa tcccccttta tggcaaggcc atccccatcg agaccatcaa gggggggagg 3540

61	cacctcattt	tctgccattc	caagaagaaa	tgtgatgagc	tcgccgcgaa	gctgtccggc	3600
	ctcggactca	atgctgtagc	atattaccgg	ggccttgatg	tatccgtcat	accaactagc	3660
	ggagacgtca	ttgtcgttagc	aaaggacgct	ctaatagacg	gctttaccgg	cgaattcgac	3720
	tcagtgatcg	actgcaatac	atgtgtcacc	cagacagtcg	acttcagcct	ggaccogacc	3780
	ttcaccattg	agacgacgac	cgtgccacaa	gacgcggtgt	cacgctcgca	gcggcggaggc	3840
	aggactggta	ggggcaggat	gggcattttac	aggtttgtga	ctccaggaga	acggccctcg	3900
	ggcatgttcc	attcctcgtt	tctgtgcgag	tgtatgacg	cgggctgtgc	ttggtacgag	3960
	gacagcccg	ccgagacctc	agttagggtg	cgggcttaac	taaacacacc	agggttgccc	4020
	gtctgcagg	accatctgga	gttctggggg	agcgtcttta	caggccctcac	ccacatagac	4080
	gccattttct	tgtcccagac	taagcaggca	ggagacaact	tcacctacct	ggtagcatac	4140
	caggctacgg	tgtgcgccag	ggctcaggct	ccacctccat	cgtgggacca	aatgtggaag	4200
	tgtctcatac	ggctaaaagc	tacgctgcac	gggccaacgc	cctgtctgta	taggtcggga	4260
	gcggttcaaa	acgaggttac	taccacacac	cccataacca	aatacatcat	ggcatgcatg	4320
	tcggctgacc	tggaggtcgt	cacgagcacc	tgggtgctgg	taggcggagt	cctagcagct	4380
	ctggcccgct	attgcctgac	aacagggcag	gtggtoattg	tgggcaggat	catcttctcc	4440
	ggaaagccgg	ccatcatctc	cgacagggaa	gtcctttacc	gggagtkaga	tgagutggaa	4500
	gagtgccgct	cacacctccc	ttacatcgaa	cagggaatgc	agctcgccga	acaattcaaa	4560
	cagaaggcaa	tcgggttctc	gcaaacagcc	accaagcaag	cggaggctgc	tgctcccggt	4620
	gtggaatoca	agtggoggac	cctogaagcc	ttctgggcga	agcatatgtg	gaatttctac	4680
	agcgggatac	aatattttagc	aggcttctcc	actctgcttg	gcaacccccc	gatagcatca	4740
	ctgatggcat	tcacagcctc	tatcaccagc	ccgctcacca	cccaacatac	cctcctgttt	4800
	aaactctctg	ggggtatgggt	ggcgcgcgaa	cttctctctc	ccagcgtctg	ttctgctttc	4860
	gtagcgcggc	gcacogctgg	agcggctgtt	ggcagcatag	gccttgggaa	ggtgcttctg	4920
	gatatttttg	caggttatgg	agcaggggtg	gcaggcgcgc	tcgtggcctt	taaggctcatg	4980
	agcggcgaga	tgcctctcac	cgaggacctg	gttaacctac	tcctctctat	cctctccctc	5040
	ggcgccctag	tcgtcggggt	cgtgtgcgca	gcgatactgc	gtcgcaagct	gggcccaggg	5100
	gagggggctg	tcgagtggat	gaacccgctg	atagcgttctg	cttcgcgggg	taaccaogtc	5160
	tcctccacgc	actatgtgct	tgagagcgac	gctgcagcac	gtgtcactca	gatcctctct	5220
	agltctacca	tcactcagct	gctgaagagg	cttcaccagt	ggatcaacga	ggactgctcc	5280
	acgccatgta	ccggctctgt	gctaagagat	gtttgggatt	ggatatgcac	ggtgttgact	5340
	gatttcaaga	cctggctcca	gtccaagctc	ctgcgcggat	tgccgggagt	ccctctcttc	5400
	tcattgtcaac	gtgggtacaa	gggagctctg	cggggcgacg	gcacatgca	aaccacctgc	5460
	ccatgtggag	ccagatcac	cggacatgtg	aaaaacgggt	ccatgaggat	cgtggggccc	5520
	aggacctgta	gtaacacgtg	gcattggaaaca	ttcccaatta	acgcgtacac	cacgggcccc	5580
	tgccagccct	ccccggcgcc	aaattattct	agggcgctgt	ggcggttggt	tgtctaggag	5640
	tacgtggagg	ttacgcgggt	gggggatttc	cactacgtga	cgggcagcac	cactgacaac	5700
	gtaaaagtgc	cgtgtcaggt	tcgggcccc	gaattcttca	cagaagtga	tggggtgctg	5760
	ttgcacaggt	acgctccagc	gtgcaaaacc	ctctacaggg	aggaggtcac	attccttggtc	5820
	gggtccaact	aatactgggt	tgggtcacag	ctcccatcg	agcccgaaac	ggagctagaa	5880
	gtgctcaact	ccatgctcac	cgacccctcc	cacattaccg	cggagacggc	taagcgtagg	5940
	ctggccaggg	gatctccccc	ctccttggcc	agctcatcag	ctagccagct	gtctgcgcct	6000
	tccttgaagg	caacatgcac	taccgctcat	gaactccccc	acgctgaact	catcgaggcc	6060
	aacctcctgt	ggcggcaggga	gatggggcgg	aacatcaccc	gcgtggagtc	agaaaaaag	6120
	gtagttaatt	tggactcttt	cgagccgctc	caagcggagg	aggatgagag	ggaagtatcc	6180
	gttcggcggt	agatcctcgg	gaggtccagg	aaattccctc	gagcgatgac	catatgggca	6240
	cgcgcggatt	acaaacctcc	actgttagag	tcctggaagg	accgggacta	agtcctctca	6300
	gtcgtacaag	gggttccatt	gcgcctctgc	aaaggccctc	cgataccacc	tccacggagg	6360
	aagaggacgg	ttgtctctgt	agaattctac	gtgtctctct	ccttgccgga	gctccgccca	6420
	aagacctctg	gcagctccga	atcgtcggcc	gtcgacagcg	gcacggcaac	ggcctctcct	6480
	gaccagccct	ccgacgavcg	cgacgaggga	tcgacgctg	agtcgtactc	ctccatgcc	6540
	ccctttaggg	gggagccggg	ggatcccgat	ctcagcgacg	ggtcttggtc	taccgtaagc	6600
	gaggaggcta	gtgaggagct	cgtctgctgc	tcgatgtcct	acacatggac	aggcgccctg	6660
	atcagcccat	gcgctcgcca	ggaaaccaag	ctgcccatca	atgcactgag	caactctttg	6720
	ctccgtcac	acaaacttgg	ctatgttaca	acatctcgca	gcgcaagcct	gcggcagaag	6780
	aaggtcacct	ttgacgaact	gcaggtccct	gaagacccat	accgggagct	gctcaaggag	6840
	atgaaggcga	aggcgtccac	agttaaaggct	aaacttctat	ccgtggaggga	agcctgttaag	6900
	ctgacgcccc	cacattcgcc	cagatctaaa	tttggctatg	gggcaaaagg	cgtccggaa	6960
	ctatccagca	aggccgttaa	ccacatccgc	tcctgttgga	aggacttctg	ggaagacact	7020
	gagacaccaa	ttgacaccaa	catcatggca	aaaaatgagg	ttttctcgct	ccaaaccagag	7080
	aagggggggc	gcaagccagc	tcgcctttac	gtattccacg	atttgggggt	tcgtgtgtgc	7140
	gagaaaatgg	ccctttacga	tgtggtctcc	acctccctcc	aggccgtgat	gggctcttca	7200
	tacggatttc	aatactctcc	tggacagcgg	gtcgagttcc	tggtagaatgc	ctggaaagcg	7260
	aagaaatgcc	ctatgggctt	cgcatalgac	acctgctgtt	ttgactcaac	ggtcactgag	7320
	aatgacatcc	gtgttgaggga	gtcaatctac	caatgttgtg	acttggcccc	cgaagccaga	7380
	caggccataa	ggtcgctcac	agagcggctt	tacatcgggg	gccccctgac	taattctaaa	7440
	gggcagaaac	gcggctatcg	ccggtgcgcg	gcgagcgggt	tactgacgac	cagctgcggt	7500

63				64			
aataccctca	catgttactt	gaaggccgct	gcggccctgtc	gagctgcgaa	gctccaggac	7560	
lgcaccgalgc	tcgtatgcgg	agacgacctt	gtcgtllalct	gtgaaagcgc	ggggacccaa	7620	
gaggacgagg	cgagcctacg	ggccttcacg	gaggctatga	ctagataactc	tgccccccct	7680	
ggggaccggc	ccaaaccaga	atacgacttg	gagttgataa	catcatgctc	ctccaatgtg	7740	
tcagtcggcg	acgatgcac	tggcaaaagg	gtgtactatc	tcacccgtga	ccccaccacc	7800	
ccocttgccg	gggctgcgtg	ggagacagct	agacacactc	cagtcgaattc	ctggctaggc	7860	
aacatcatca	tgtatgcgcc	caccttgtgg	gcaaggatga	tcctgatgac	tcattttcttc	7920	
tccatccttc	tagctcagga	acaacttgaa	aaagccctag	attgtcagat	ctacggggcc	7980	
tgttactcca	ttgagccact	tgacctacct	cagatcattc	aacgactcca	tggccttagc	8040	
gcattttcac	tecatagtta	ctctccaggt	gagatcaata	gggtggcttc	atgcctcagg	8100	
aaacttgggg	caccgccctt	gcgagtctgg	agacatcggg	ccagaagtgt	ccgcgctagg	8160	
ctactgtccc	aggggggggag	ggctgccact	tgtggcaagt	acctcttcaa	ctgggcagta	8220	
aggaccaagc	tcaaaactcac	tccaatcccg	gctgcgtccc	agttggattt	atccagctgg	8280	
ttcgttgctg	gttacagcgg	gggagacata	tatcacagcc	tgtctcgtgc	ccgacccccc	8340	
tgggttcattg	ggtgcctact	cctactttct	gtaggggtag	gcattctatct	actccccaac	8400	
cgatgaacgg	ggagctaaac	actccaggcc	aataggccat	cctgtttttt	tccctttttt	8460	
ttttttcttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ctcctttttt	tttccctcttt	8520	
ttttcttttt	ctttcttttg	gtggctccat	cttagcccta	gtcacggcta	gctgtgaaag	8580	
gtccgtgagc	cgcttgactg	cagagagtgc	tgatactggc	ctctctgcag	atcaagt	8637	

【0129】

【外10】

65

66

<210> 3
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

```

<400> 3
gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag ttctctgacg cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtgggtct cggaaacggg gattacaccc gaattgccag 180
gacgacccgg tcccttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gogtgcccc 240
gogagactgc tagccagta gtgttgggtc gogaaaggcc ttgttggtact gctgatagg 300
gtgcttgcga gtgcccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacy aatcctaaac 360
ctcaaaagaa aaccaaactg aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggtto tccgggcgct tgggtggaga ggtatttcgg ctatgactgg gcaacaacga 480
caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc cgggttcttt 540
ttgtcaagac cgaacctgtc gggtccctga atgaactgca ggaaggagca gcgcggctat 600
cgtggctggc cagcaggggc gtctccttgg cagctgtgct cagcgttctc actgaaggcg 660
gaaggagact gctgctattg ggcgaagtgc cggggcaggc tctcctgtca tctcaccctg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggttgcac acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccagcgca aacatcgcat cgaagcagca cgtactcgga 840
tggaaagcgg tcttctcgat caggtatgat tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcacag 900
cogaactgtt cgcagggctc aaggcggcga tgcocgacg cagggatctc gtcgtgacc 960
atggcagatg ctgcttgcgg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggaattcatg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggacggct atcaggacat agcgttgggt acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaattggctc acgccttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc cagcgcgcat gcccttctat gcccttctga cgaattcttc tgagtttaaa 1200
cagaaccaca cgggttccct ctaggcggat caattccgce cctctccctc cccccccct 1260
aaogttactg gccgaagcgc cttggaataa ggcgggtgtg cgtttgctca tatgttattt 1320
tccacatatt tgcgttcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctctg 1380
acgagcattc ctagggtgtc ttccctctc gccaaaggaa tgcagggtct gttgaatgtc 1440
gtgaaggaa cagttcctct ggaagcttct tgaagcaaaa caacgtctgt agcgaacctt 1500
tgcagcagc ggaacccccc accctggcga aggtgcclct gcggccaaaa gcaacgtgtc 1560
taagatcac ctgcaaaagg gcgcaacccc cagtgcacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagta aatgctcttc ctcaagcgtc ttcaacaagg ggcgtgaagg tgcccagaag 1680
gtacccatt gtatgggata tgcctctggg cctcgggtga catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaagctta ggcgcccgca accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
ccatataata ccatggcgcc tattaaggcc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatcatca ctagcctcac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaaagc 1920
gtctccacgc caacacaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcgtgtg ttggaatgtc 1980
tctcctgtg cgggtcctaa gaccccttgc ggcacaaagg gccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgttg accaggacct cgtcgggtcg caagcgcccc ccggggcgcg ttctctgaca 2100
ccatgcacct gggcagctc ggacclttac ttgttcaga ggcattgcga lgtcattcog 2160
gtgcgcgggc gggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggcccgct ctctactctg 2220
aagggtctct cggcggtccc actgctctgc ccctcggggc acgctgttgg vatctltcgg 2280
gctgcogtgt gcacccgag ggttcgaag gcggtggact ttgtaccogt cgaagtctatg 2340
gaaaccacta tgcggtcccc ggtcttcaag gacaactcgt cccctccggc cglaccgcag 2400
acattccagg tggcccatct acacgccccct actggtagcg gcaagagcac taaggtgcog 2460
gctgcgtatg cagcccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgtccgt cgcggccacc 2520
ctaggtttcg gggcgtatat gtctaaggca catggtatcg accctaactc cagaaccggg 2580
gtaaggacca tcaaccaagg tgcccccac acgtactcca cctatggcaa gtttcttggc 2640
gacggtgtgt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaat 2700
gactcgacca ctatcctggg catcgggaca gtccctggac aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgtcg tgcctgcac cgtcacgctc ccgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatcccc tttatggcaa agccatcccc 2880
atcgagacca tcaagggtgg gaggcacctc atttctctgc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgtct tagcatatta ccggggccct 3000
gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgtctaatg 3060
acgggttlla ccggcgtatt cgaactcagtg atcgactgca atacaagtg caccagaca 3120
gtcgacttca gcttggaccc gaecttcaac attgagacga cgaaccgtgc acaagacggg 3180
gtgtcacgct cgcagcggcg aggcaggact ggtaggggca ggaatggcat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctccggcatg ttcatctctc cggltctgtg cgaagtctat 3300
gaecgcggct gtgcttggta cgaactcag ccgcgcgaga cctcagttag gttgcgggct 3360
taactaaaca caccagggtt gcccgctcgc caggacatc tggagttctg ggagagcgtc 3420
tttacaggcc tcacccaact agacggccat ttcttctccc agactaagca ggcaggagac 3480
aatctccctc acctggttag ataccaagct acggtgtgcg ccagggtcga ggtccacct 3540

```

【0130】

【外11】

67

cuatcgtggg accaaatgtg gaagtgtctc atacggctaa agcctaagct gcacgggcca 3600
 augccctctgc tctataggct gggagccgtt caaaacgagg ttactaccac acaccccata 3660
 accaaatata tcatggcatg catgtcggct gacctggagg tctcaccag cacttgggtg 3720
 ctggtaggcg gagtccatag acgtctggcc gcgtatggcc tgacaacagg cagcgtgggtc 3780
 atttggggca ggatcatcct gtccggaaag ccggccatca ttcccgacag ggaagtccct 3840
 taccgggggt tcatggagat ggaagagtgc gcttcacacc tcccttaccat cgaacaggga 3900
 atgcagctcg ccgaacaatt caaacagaag gcaatcgggt tgcctgcaaac agcaaccaag 3960
 caacgggagg ctgctgtctc cgtgttgga tccaagtggc ggacctcoga agcctctgg 4020
 ggcgaagcata tgttgaattt catcagcggg atacaatatt tagcaggctt gtccactctg 4080
 cctggcaaac ccggatagag atcactgatg gcattcacag cctctatcac cagcccgctc 4140
 accacccaac ataccctct gttaacatc ctggggggat ggttggccgc ccaacttctc 4200
 cctcccgagg ctgctctctg tttcgtaggc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 ataggccttg ggaagggtct tgttgatatt ttggcagggt atggagcagg ggtggcaggc 4320
 ggcctcgtgg cctttaaggt catgagcggc gagatgccct ccaccgaggc cctggttaac 4380
 ctactcctct ctatcctctc ccctggcgcc ctagtctgct ggtctgtgtg cgcagcgata 4440
 ctgcctggcg accgtgggccc aggggagggg gctgtgaggt ggaatgaacc gctgatagcg 4500
 ttccgtcttc ggggttaacca cgtctccccc acgcactatg tgcctgagag cgcagctgca 4560
 gcaactgtca ctcagatcct ctctagtctt accatcactc agctgctgaa gaggcttacc 4620
 cagtggaaca accgaggctg ctccacgcca tgcctcgggt cgttggctaa agatgtttgg 4680
 gattggatat gcaacggtgtt gactgatttc aagacctggc tccagtccaa gctcctgccc 4740
 cgttgcggcg gagtccctct ctctcctatg caacgtgggt acaaggaggct ctggcggggc 4800
 gacggcatca tgcacaaccac ctgcccatgt ggaacacaga tccaccgaca tctgaaaaac 4860
 ggttccatga ggaactgtgg gctaggacc ttagtaaca cgtggcatgg aacattcccc 4920
 attaacgctg acaccacggg cccctgcacg cctcctcccg cgcacaatta ttctaggggc 4980
 ctgtgggggg tggctgtctg ggaatcctg gagggttaac ggttggggga ttcccaactc 5040
 gtgacgggca tgaacctga caacgttaag tgcctgtctc aggttccggc ccccgaaatc 5100
 ttccacagaag tggatggggg gcggttgcaac aggtacgctc cagcgtgcaa acccctccta 5160
 cgggaggagg tcaactcctt ggtcgggctc aatcaatacc tggttgggtc acagctccca 5220
 tgcgagcccg aaccggagct agcagtgtct acttccatgc tccaccgacc ctccacatt 5280
 accgcgagga cggctaagcg taggtctggc aggggatctc cccctcctt ggcagctca 5340
 tcaactagcc agctgtctgc gcttccctt aaggcaacal gcaactcccg tcatgaatcc 5400
 ccggagcctc acctcatcga ggcacaacct ctgtggcgcc aggaatggg cgggaacatc 5460
 acccgcttgg agtcagaaaa taaggtagta atttggact ctttcgagcc gctccaggc 5520
 gaggaggatg agagggaagt atccgttcog gaggagatcc tgcggaggct caggaaatcc 5580
 cctcgagcga tgcacatag ggcacggccc galtaacac ctccactgtt agagtcttgg 5640
 aaggaccggg actacgtccc tccagtggta caccgggtgtc cattgcggcc tgcacaggcc 5700
 cctccgatac caactccag gaggaaaggg acggttctcc tgcacgaatc taccgtgtct 5760
 tctgctctgg cggagctcgc caaaaagacc ttccggcagc ccgaatctgc ggcctctgac 5820
 agcggcagcg caacggcctc tcttgaccag cctccgagc accggcgagc gggatccgac 5880
 gctgagctgt actcctccat gcccccctt gagggggagc cgggggatcc cgtatctcagc 5940
 gtcgggtctt ggtctaccgt aagcgaggag cctagttagg accgtgtctg ctgctcgtg 6000
 tctacacat ggacaggggc cctgatcacg ccatgctgt cggaggaaac caagctgcc 6060
 atcaatgcac tgagcaactc ttgtctccgl caaccacaat tgggtctatg tacaacatct 6120
 cgcagcgcaa gcttgcggca gaagaaggto acctttgaca gactgcaggct cctggacgac 6180
 cactaccggg acgtgctcaa ggaatgaag gcgaaggcgt ccacagttaa ggctaaactt 6240
 ctatccgttg aggaagcctg taagctgacg ccccaacatl cggccagatc taaatttggc 6300
 tatggggcaa aggaagtcog gaacctatcc agcaaggcog ttaaccacat ccgctccgtg 6360
 tgggaaggact tgcctggaaga cactgagaca ccaatttgaca ccaccatcat ggcaaaaaat 6420
 gagggtttct gcgtccaaac agagaagggg ggcggcaagc cayctcgctc tatcgtatto 6480
 ccagatttgg ggttctgtgt gtgcgagaaa atggcccltt acgatgtggt ctccacccctc 6540
 cctcaggcgg tgatgggctc ttcatacgga ttccaatacl ctctggaca ggggtctgag 6600
 ttctctgtga atgcttgaa agcgaagaaa tgcctatgg gcttcgcata tgaccaaccg 6660
 tgttttgaact caacgggtcac tgagaatgac atccgtgttg agggatcaat ctaccaatgt 6720
 tctgacttgg ccccgaaagc cagacaggcc ataaggctgc tccagagcg gctttacatc 6780
 gggggccccc tgaactaattc taaaggcgag aactgcggct atcgccgtg ccgcccagac 6840
 ggtgtactga cgaacagctg cggtaatacc ctccatggt aettgaaggc cgttgcggcc 6900
 tctcagagct cgaagctcca ggaactgcag atgctcgtat cgggagacga ccttctcgtt 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaagagagc gaggcgagcc tacgggctt caccgaggct 7020
 atgactagat actctgcccc ccttggggac ccgcccacac cagaalacga cttggagttg 7080
 ataacatcat gctcctccaa tgtgtcagtc gcgcacyalg catctggcaa aagggtgtac 7140
 tatctcaccg gtgacccac caacccctt gcgggggtg cgttggagac agclagacac 7200
 actccagctc attcctggct aggcacatc atcatgtat cgcacacett tggggcaagg 7260
 atgactctga tgaactatct ctctccatc cttctagctc aggaacaccl lyaanaagcc 7320
 ctgatttgc agatctacgg ggcctgttac tccattgagc caetlgaccl acctcagatc 7380
 attcaacgac tccatggcct tagcgcattt tccctccata gttactctcc agghagatc 7440
 aatagggtgg cttcatgctt caggaaact ggggtaccgc ctttgcgagt ctggagacat 7500

68

【0131】

40 【外12】

cgggcoagaa gtgtccggcg taggtactgt tcccaggggg ggagggtgac caettgtggc 7560
 aagtaacctc tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcaactccat cccggtctgc 7620
 tccagtttgg attatccag ctggttctgt gctggttaca gcgggggaga catatatac 7680
 agcctgtctc gtgcccagac ccgctggttc atgtgtgtgc tactcctact ttctgtaggg 7740
 gtaggcatct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaatagg 7800
 ccatoctgtt tttttccctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
 tttttctctt ttttttctt ctttttttcc ttttttttcc ttttgggtggc ccatcttagc 7920
 cctagtcaag gctagctgtg aaaggctcgt gaggccgctt actgcagaga gtgctgatac 7980
 tggcctctct gcagatcaag t 8001

【0132】

【外13】

<210> 4
 <211> 7989
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 4
 gccagccccc gattqggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcaacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cclccaggac 120
 ccccccctccc gggagagoca tagtggctct cggaaccggg gactacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tccllclclg galcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgttgtaact gcccgtatag 300
 gtgcttgcca gtgcccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacc aatcctaaac 360
 ctcaaaagaaa aaccaaggcg cgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
 cggcggctctg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 480
 ctgatgcgcc cgtgttccgg ctgtcagcgc agggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 540
 acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 600
 cgacgggcgt tccctgcgca gctgtgctcg acgtttgtac tgaagcggga agggactggc 660
 tgcatttggg cgaagtgcgg gggcaggatc tctgtctate tcaacttgcg cctgcccaga 720
 aagtatccat catgctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 780
 cattgcacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcagcagc tactcggatg gaagccgggc 840
 ttgtcgatca ggtatgatcg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaaatgttgc 900
 ccaggtctaa ggcgcgcagc ccgcagcggc aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 960
 gcttgcgcaa tatcatgttg gaaaatggcc gcttttctcg attcatcgac tgtggccggc 1020
 tgggtgtggc ggaacgctat caggacatag cgttggctac cctgcatatt gctgaagagc 1080
 ttggcggcga atgggctgac cgttctctcg tgccttaacg tatcgccgct cccgattcgc 1140
 agcgcctcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agtttaaaac gaccacaacg 1200
 gtttccctct agcgggatac attccgcccc tctccctccc ccccccctaa cgttactggc 1260
 cgaagccgct tggaaaggg ccggtgttgcg ttgtctatata tgttattttc caccatattg 1320
 ccgtcttttg gcaatgtgag ggcggcgaaa cctggccctg tcttcttgac gacattcct 1380
 aggggtcttl cccclctcgc caaaggaatg caaggtctgt tgaatgtcgt gaaggaagca 1440
 gttcctctgg aagcttcttg aagacaacac acgtctgtag cgacccttgg caggcagcgg 1500
 aacccccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggcacaaagc cacgtgtata agatacacct 1560
 gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgct gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa 1620
 tggctctcct caagcgtatt caacaaggcg ctgaaggatg cccagaaggt accccattgt 1680
 atgggatctg atctggggcc tccgtgcaca tgccttaac gtgtttagtc gaggttaaaa 1740
 acgctctagc ccccccgaac caggggaagc tggttttcct ttgaaaaaca cgataataac 1800
 atggcgccca ttaaggccca ctcccaacag acgcgaggcc tacttggctg catcatcact 1860
 ggcctcacag gccgggacag gaaccaagtc gagggggagg tccaagtgtt ctcacccgca 1920
 acacaatctt cctggcgac ctgcgtcaat ggctgtgttt ggaactgtct tcatggtgac 1980
 ggctcaaaag cccctggcgg cccaaagggc ccaatcaccc aaatgtacac caatgtggac 2040
 caggacctcg tggctggca agcgcctccc ggggcgcgct ccttgacacc atgcacctg 2100
 ggagctcgg acctttactt ggtcaagagg catgcccagc tcaatccggt cgcgcggggg 2160
 ggcgacagca gggggagcct actctcccc aggcctctct cctacttgaa gggctcttcg 2220
 ggcggtccac tgcctgccc ctccggggcgc gctgtgggca tcttccgggc tgcctgtgac 2280
 acccgagggg ttggaagggc ggtggacttt gtacccgtcg agtctatgga aacccatag 2340
 cggctcccgg tcttcaagg caactcgtcc cctccggcgg taccgcagac attccagggt 2400
 gcccatctac acgcccctac tggtagcgcc aagagcacta aggtgccggc tgcgtatgca 2460
 gcccagggt ataaggctgt tgtcctgaac ccgtccgtcg ccgccaccct aggtttcggg 2520
 gcgtatatgt ctaaggcaca tggtagcag cctaaccatca gaaccggggt aaggaccatc 2580
 accacgggtg ccccatccac gtactccacc tatggcaagt ttcttgccga cgggtggttcg 2640
 tctggggggc cctatgacat cataatatgt gatgagtgc actcaactga ctgacccact 2700
 atcctgggca tccgacaggt cctgyaauaa gggagagcgg ctggagcgcg actegtcgtg 2760
 ctcgccaccg ctacgctccc gggatcgggc accgtgccac atccaaacat cgaaggagtg 2820
 gctntgtcca gaactggaga aatccccttt tatggcaag ccaccccacat cgaagaccatc 2880
 aaggggggga ggcacctcat ttctgcccac tccaagaaga aatgtgatga gctcgccggc 2940
 aagctgtccg gcctcggaat caatgctgta gcataattacc ggggccttga tgtatccgtc 3000
 acaccaacta cgggagacgt catgtgtgta gcaacggagc ctctaattga ggcctttacc 3060
 ggcgatttgc actcagtgat cgaactcaat acatgtgtca cncagacagt cgaactcagc 3120
 ctggacccca ccttcaccat tgagacgag accgtgccac aagacggcgt gtacgctcg 3180
 cagcggcgag gcaggactcg taqgggcagg atgggcattt acaggtttgt gactccaggga 3240
 gaacggccct cgggcattgt cgaattcccg gttctgtcgg agtgcctatga cgcgggctgt 3300
 gcttgggtac agctcagcgc cgcggagacc tcaagtaggt tgcgggctta cctaaccaca 3360
 ccagggttgc ccgtctgcca ggaacctctg gacttctggg agagcgtctt tacaggcctc 3420
 accccatag acgcccattt cttgtccag actaagcagg caggagacaa cttcccctac 3480
 ctggtagcat accaggctac ggtgtgcggc agggctcagg ctccacctcc atcgtgggac 3540

71

caaatgtgga agtctctcat acggctaaag cctacgctgc acggggccaaac gcccctgctg 3600
 tataggctgg gagccgttca aaacgaggtt actaccacac accccataac caaatacatc 3660
 atggatgca tctcgggtga cctggaggtc gtcacgagca cctgggtgct ggtaggcgga 3720
 gtccatagca ctctggcgcc gtattgctctg acaacaggca gcttggtcat tctgggcagg 3780
 atcatcttct cgggaagacc ggccatcatt cccgacaggg aaglccltta ccgggagttc 3840
 gatgagatgg aagagtgcgc ctcaacctc ccttacatcg aacagggaat gcagctcgcc 3900
 gaacaattca aacagaaggg aatcgggttg ctgcaaacag ccaccaagca agcggaggct 3960
 gctgctcccg tggtagaatc caagtggcgg aacctogaag cctctctggc gaagcatatg 4020
 tggaaattca tcagcgggat acaatttla gcaggttct ccactctgcc tggcaacccc 4080
 gcgatagcat cactgatggc attcacagcc tctatcacca gcccgctcac caccacaacat 4140
 accctcctgt ttaacatcct ggggggagtg gtggcggccc aacttgctcc tccagcgct 4200
 gcttctgctt togtaggcgc cggcatcgct ggagcggtct ttggcagcat aggccttggg 4260
 aaggtgcttg tggatatttt ggaggttat yggaggggg tggcaggcgc gctcgtggcc 4320
 ttttaggtca tgagcggcga gatgccctcc accgaggacc tgggttaact actccctgct 4380
 atoctctccc ctggcgccct agtctgtcgg gtctgtgtcg cagcgatact gctcgggca 4440
 gtggggccag gggagggggc tgtgcagtgg atgaaccggc tgatagcgtt cgtctcggcg 4500
 ggttaaccag tctccccac gactatgtg cctgagagcg acgctgcagc acgtgtcact 4560
 cagatcctct ctagtcttac catcactcag ctgtctgaag ggcttcacca gtggatcaac 4620
 gaggaatgct caacgccatg otcgggctcg lggctaagag atgtttggga ttggatatgc 4680
 acggtgttga ctgatttcaa gacttgctc cagtccaagc tctcggcgcc attgcgggga 4740
 gtccctctct tctcatgtca acgtgggtac aagggagttt ggcgggggca cggcatcatg 4800
 caaaccaccc gccatgttgg agcacagatc accggacatg tgaataacgg tccatgagg 4860
 atogtggggc claggacctg tagtaacacg tggcatggaa cattccccat taacgcgtac 4920
 accacgggccc cctgcacgccc ctccccggcg ccaattatt ctaggcgctt gggcggggtg 4980
 gctgctgagg agtacgttga ggttacgccc gtgggggatt tccactacgt gacggycatg 5040
 accactgaca acgttaagtg cccgtgtcag gttccggccc ccgaattctt caccagaagt 5100
 gatgggggtg ggttgacag gcgtgcacaa cctcctacg ggagagggtc 5160
 acattctctg tggggtcaa tcaatacctg gttgggtcac agctcccatg cagccccgaa 5220
 ccggagctag cagtgtctac ttccatgtct accgacccct cccacattac ggcggagacg 5280
 gctaagctga ggtgtggcag gggatctccc cctccttgg ccagctcatc agctagccag 5340
 ctgtctgccc ctctcttgaa ggcaacatgc actacccgtc atgactcccc ggacgtgac 5400
 ctcatcgagg ccaacctctt gtggcgccag gagatggcg ggaacatcac ccggtggag 5460
 tcagaaata aggtagtat tttggactct tctgagcgc tccaaaggga ggaggtatg 5520
 agggaggtat cgtgtccggc ggagatcttg cggaggtcca ggaattccc tccagcgatg 5580
 cccatgtggc cagccccgga ttacaacctt ccactgttag agtctggaa ggacccggac 5640
 tacgtctctc cagtgttaca cgggtgtcca ttgcggcttg ccaaggcccc tccgatacca 5700
 cctccacgga ggaagaggac ggttgtcttg tcagaatcta ccgtgtcttc tgccttggcg 5760
 gagctcgcca caaagacctt cggcagctcc gaatctgttg ccgtcgacag cggcacggca 5820
 accgctctct ctgaccagcc ctccgagcac ggcgacggcg gatccgact tgaagtctac 5880
 tctctcatgc ccccccttga gggggagccc ggggatcccc atctcagcga cgggtcttgg 5940
 tctacgttaa gcgagggagg tagtgaggac gtctgtctgt gctogatgtc ctacacatgg 6000
 acaggcgccc tgatcacgccc atgcgtctgc gaggaaacca agctgcccc caatgcactg 6060
 agcaactctt tgcctccgtc caacaacttg gtctatgcta caacatctcg cagcgcaagc 6120
 ctgcggcaga agaaggtcac ctttgacaga ctgcaggctc tggacgacca ctacggggac 6180
 gtgtccagg agatgaaggc gaaggcgctc acagttaagg ctaaaactct atccgtggag 6240
 gaagctgta agctgacgccc cccacattcg gccagatcta aatttggcta tggggcaagg 6300
 gacgtccgga acctatccag caaggccgll aaccacatcc gctccgtgtg gaaggacttg 6360
 ctggaagaca ctgagacacc aattgacacc accatcatgg caaaaaatga ggttttctgc 6420
 gtccaaaccag agaagggggc ccgcaagcca gctcgeetta tegtattccc agaltlggg 6480
 gttcgtgtgt gcgagaaaat gyccctttac gatgtgtctt ccacccctcc tccaggccgtg 6540
 atgggctctt catacggatt ccaatactct cctggacagc gggctcaggt cctgggtgaat 6600
 gcttggaag cgaagaaatg cccatggggc ttccgatatg acccccgctg ttttgactca 6660
 acggtcactg agaatgacat cctgttgtag gagtcaatct accaatgttg tgactttggc 6720
 ccgagagcca gacagggcat aaggtcgtct acagagcggc tttaatalcg gggccccctg 6780
 actaattcta aagggcagaa ctgcggtctat cgcgggtgccc gcgcgagcgg tgtactgacg 6840
 accagctgcg gtaataccct cacatgtttac ttgaaggcgg ctgcggcctg tccagctgcg 6900
 aagctccagg actgcaegat gctcgtatgc ggagacgacc ttgtcgttat ctgtgaaagc 6960
 gcggggacccc aagaggacga ggcgagccta cgggcttca cggaggtat gactagatac 7020
 tctgcccccc ctggggaccc gcccaacca gaatacgaat tggagttgat aacatcatg 7080
 tcttccaatg tgtcagtcgc gcaagatgca tctggcaaaa ggggtgacta tctcaacccg 7140
 gaccccaacca ccccccttgc gcgggctgog tgggagacag ctgacacac tccagtcaat 7200
 tctgtgctag gcaacatcat catgtatgcg ccaaccttgi gggcaaggat gatcctgatg 7260
 actcatttct tctccatctt tctagctcag gaacaacttg aaaaagccct agattgtcag 7320
 atctacgggg cctgttactc cattgagcca cttgacctac ctcatatcat tcaacgactc 7380
 calgggctta ggcattttt actccatagt tactctccag gtgagatcaa taggggtgct 7440
 tcatgctca ggaacttgg ggtaccgccc ttgcgagctt ggagacatcg ggcccaagt 7500

72

【0134】

gtcggcgcta ggtactgtc ccaggggggg agggctgcca cttgtggcaa gtacctctc 7560
 aactggggcag taaggaccaa gctcaaacct actccaatcc cggctgcgtc ccagttggat 7620
 ttatccagct ggttctgttc tgggttacagc gggggagaca tatatcacag cctgtctcgt 7680
 gccgagcccc gctggttcat gtggttccca ctctacttt ctgtagggtt aggcactcat 7740
 ctactcccca accgatgaac ggggagctaa aactccagg ccaataggcc atcctgttct 7800
 tttccctttt ttttttctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttctctcttt 7860
 tttttctct ttttttctt ttctttctt ttctttctt ttctttctt ttctttctt 7920
 tagctgtgaa aggtccgtga gccgcttgac tgcagagagt gctgatactg gctctctctg 7980
 agatcaagt 7989

40 【外15】

【0135】

【外16】

73

<210> 5
 <211> 8649
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 5

```

gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgtg ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaaccgt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgacccgg tcccttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
ggagagactg tagccgagta gtgttgggtc gogaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaaaagaa aaccaaacyt aacaccaacg ggccgycat gatgaacaa gatggattgc 420
acgcagggttc tccggccgct tgggtggaga ggcatttcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggctg ctctgatgcc gccctgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgaacctgtc ggccocctga atgaactgca ggaagaggca gcgaggctat 600
cgtggctggc cagcaacggc gtctcttgcg cagctgtgct cgaagttgtc actgaagcgg 660
gaagggaactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctctgtca tctcaccctg 720
ctcctgcgca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtcgcat acgcttgatc 780
cggctaccctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcagca cgtactcgga 840
tggaaagccg tcttctgat caggatgac tggacgaaga gcacagggg ctcgcgcag 900
cggaactgtt cgccaggtcc aagcgcgcga tgcgcgaagg cgaggtatcc gtcgtgacc 960
atggcgatgc ctgcttgcgc aatatcatgg tggaaaaatg ccgctttctt ggattcatcg 1020
actgtggcgc gctgggtgtg gcggacgcct atcaggaact agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcgcg gaatgggctg accgttctct cgttccttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gccctctatc gccctcttga cgaattcttc tgaatttaaa 1200
cagacccaaa cgglttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccctc ccccccctct 1260
aacgttactg gccgaagcgc cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatata tgccttcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tctctctctt 1380
acgagcattc ctagggtgtc ttccctctc gccaaaggaa tgcagggtct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttctctc ggaagcttct tgaagacaaa caactgtctg agcgaccctt 1500
tgcaggcgagc ggaacccccc acctggcgac aggtgctctc gcggccaaaa ggcacgltta 1560
taagatacac ctgcaaaagg ggcacacccc cagtgccacg ttgtgatttg gatagttgtg 1620
gaagaggtca aatggctctc ctcaacagga ttcaacaagg ggctgaagga tgcacagaag 1680
gtaccccatc gtatgggata tgatctgggg cctcgggtga catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaagctca ggcccccgca accacgggga cgtggttttc cttgaaaaa 1800
cacgataata ccattgacgc ggagatggca goattgtgog gaggcgcggt ttctgtaggt 1860
ctgatactct tgacctgttc acctgactat aagctgttcc tgcctaggct catatggttg 1920
ttacaatatc tlatcacagc ggccgaggca cacttgcaag tgtggaatcc cccctcaac 1980
gttcgggggg gcccgatgco cgtatctctc ctacgtgog cgtacacccc agagctaatc 2040
tttaccatca ccaaaatctt gctcgccata ctggtccac tcatggtgnt ccaggctggt 2100
ataacccaaag tgcgtactt cgtgcgcga cccgggtcca ttctgtcatg catgctggtg 2160
cgggaaggtt ctgggggtca ttatgtccaa atggtctcca tgaagtggc cgcactgaca 2220
gglaagctac ttatgacca tctcaaccca ctgcccgaac gggccacgc gggcctaaga 2280
gaacctgcgg tggcagttga gcccgctgct tctctgata tggagaccaa ggttatcac 2340
tggggggcag acacgcggc gtgtggggac atcatcttgg cctgcccgt ctccgcgcgc 2400
agggggaggg agatacatct gggacccgca gacagccttg aagggcaggg gtggcgactc 2460
ctogcgcta ttacggcta ctcccaacag acgcgaggcc taettggctg cateactact 2520
agcctcacag gccgggacag gaacacggtc gagggggagg tcaaagtggc ctccacgcga 2580
acacaaatct tcttggcgac ctgctgaat ggcgtgtgtt ggaactgtca tcatggtgac 2640
ggctcaaaag ccttgcggc cccaaagggc ccaatcaccc aatgtacac caatgtggac 2700
caggacctcy lcygclggca aycccccgc gggcgcggtt ccttgacacc atgcacctgc 2760
ggcagctcgg acctttactt ggtacagagg catgcgatg tcatccgggt gcgcggggcg 2820
ggcgacagca gggggagcct actctcccc aggcctgctc cctacttgaa ggcctcttcg 2880
ggcggtccac tgcctctgcc ctccgggcac gctgtgggca tcttccgggc tgcctgtgtc 2940
accgaggggg ttgcgaaggg ggtggaottt gtaocgtag agtotatgga aacocactatg 3000
cggctcccgg tcttcacgga caactcgtcc cctccggcgg taccgcagac attccaggctg 3060
gccccatctc acgccccctac tggtagcggc aagagcacta aggtgcgggc tgcgtatgca 3120
gccccagggt ataaggtgct tgtcctgaac cgtccgtcg ccgcacacct aggtttccggg 3180
gcgtatatgt ctaaggcaca tggtatcgac cctaactca gaacccgggt aaggaccatc 3240
accacgggtg ccccatcac gtaactccac tatggcaagt ttcttgcgga cgggtggttcg 3300
tctggggggc cctatgacat cataataty t gatgagtgcc actcaactga ctgacacact 3360
atcctgggca tggcaccagt cctggaccaa gcggagacgg ctggagcgcg actcgtcgtg 3420
ctgcgcacgc ctaacgctcc gggatcggtc accgtgccac atccaaactc cgaagaggtg 3480
gtctgttcca gcaactggaga aatccccctt talygaaag ccatcccatc cgagaccatc 3540

```

74

75	aagggggggg	ggcaactcat	tttctgccat	tccaagaaga	aatgtgatga	gctcggccgg	3660
	aagctgtccg	gctctggact	caatgtctga	gcataatlac	ggggccctga	tgatcccgct	3660
	ataccaaacta	gaggagacgt	cattgtcgta	gcaacggagc	ctctaattga	gggctttacc	3720
	ggcgattttcg	ucltugtgat	cgactgcaat	acatgtgtca	cccagacagt	cgactttcagc	3780
	ctggaccocga	ccttcaccat	tgagacgacg	acggcgccac	aagacggcgt	gtcagcgtcg	3840
	cagcggcgag	gcaggactgg	taggggcagg	atgggcatbt	acaggtttgt	gactccagga	3900
	gaauvgccct	cgggcatgtt	cgatttcccg	gttctgtgag	agtgtcatga	cgccggcgtt	3960
	gctttggtacg	agctcacgac	cgccgagacc	tcagtttagt	tgccggctta	cctaaacaca	4020
	ccagggltgc	ccgtctgcga	ggacatctcg	gagttctggg	agagcgtctt	tacaggccctc	4080
	acccacatag	acgcccattt	cctgtcccag	actaagcagg	caggagacaa	cctcccctac	4140
	cbggtagcat	accaggctac	ggtgtgcgoc	agggctcagg	ctccacctcc	atugtgggac	4200
	caaatgtgga	agtgtctcat	acggctaaag	cctacgctgc	acgggccaac	gcccctgctg	4260
	tataggctgg	gagccgttca	aaacgaggtt	actaccacac	accccataac	caaatatcac	4320
	atggcatgca	tgctgggtga	cctggaggctc	gtcacgagca	cctgggtgct	ggtaggcgga	4380
	ctccagacga	ctctggccgc	gtattgcctg	acaacaggca	gcgtggtcat	tgtggggcagg	4440
	atcatctctgt	ccggaaagcc	ggccatcatt	cccgacaggg	aagtccctta	ccgggagltc	4500
	galgagatgg	aagagtgcgc	ctccacacct	ccttaccatg	aacagggaat	gcagctcgcc	4560
	gaacaaattca	aacagaagcc	aatcggtgtg	ctgcaaacag	ccaccaagca	agcggaggct	4620
	gctgtccccc	tggtggaatc	caagtggcgg	acccctgaag	cctctctggc	gaagcctatg	4680
	tggaatttca	tcagcgggat	acaatattta	gcagggttgt	ccactctgcc	tggaaccccc	4740
	gcgtagatcat	cactgtatggc	attcacagcc	tctatcccca	gcccgcctac	cacccaacat	4800
	acccctccgt	ttaacatcct	ggggggatgg	gtggcccgcc	aacttgctcc	tcccagcgct	4860
	gcttctgctt	tcgtaggcgc	cgccatcgct	ggagccgctg	ttggcagcat	aggccttggg	4920
	aaggltgctlg	tggtatatctt	ggcaggttat	ggagcagggg	tgccagggcg	gctcgtggcc	4980
	tttaaggctca	tgagcggcga	gatgccctcc	accgaggacc	tggttaacct	actccctgct	5040
	atcctctccc	ctggccgccc	agtcgtcggg	gtcgtgtgag	cagcgatact	gcgtcggcac	5100
	gtgggcccag	gggagggggc	tggtgcagtgg	atgaacggcg	tgatagcggt	cgtttcgccg	5160
	ggtaaccacg	tctcccccac	gcactatgtg	cctgagagcg	acgtctcage	acgtgtcact	5220
	cagatcctct	ctagtcttac	calcuactcag	ctgctgaaga	ggcttcacca	gtggatcaac	5280
	gaggactgct	ccagcccatg	ctccggctcg	tggttaagag	atgtttggga	ttggatatgc	5340
	acggtgttga	ctgatttcaa	gaactggctc	cagtcacaagc	tctgtcccgcg	attgcccggga	5400
	gtccctctct	tctcatgtca	acgtgggtac	aaggaggtct	ggcggggcga	cggcatcatg	5460
	caaaaccact	gcccattgag	agcacagatc	accggacatg	tgaaaaacgg	ttccatgagg	5520
	atcgtggggc	ctaggacctg	tagtaaacag	tgccatggaa	cattccccat	taacgcgtac	5580
	accacggggc	cctgcacggc	ctcccccggc	ccaaattatt	ctaggggcgct	gtggcggttg	5640
	gctgtctagg	agtcactgga	gggttaacgg	gtgggggatt	tcactactgt	gacgggcatg	5700
	accactgaca	acgtlaaagt	cccggtgcag	gttcggggcc	ccgaattctt	cacagagtg	5760
	gatgggtctg	gggttgcaac	gtacgctcca	gogtgcaaac	ccctcctaag	ggaggaggtc	5820
	acattcctgg	tcgggctcaa	lcaataacct	gttgggtcac	agctcccatg	cgagcccgaa	5880
	ccggacgtag	cagtgtctac	ttccatgctc	accgacccct	ccacacattc	ggcggagagc	5940
	gctaagcgta	ggctgggcag	gggatctccc	ccctccttgg	ccagctccac	agctagccag	6000
	ctgtctgcgc	cctccttga	ggcaacatgc	actacccgtc	atgactcccc	ggagcgtgac	6060
	ctcatcgagg	ccaaacctct	gtggcggcag	gagatcgggc	ggaaatccac	ccgcgtggag	6120
	tcagaaaaata	aggtagtta	tttggactct	ttcgagccgc	tccaagcgga	ggaggatgag	6180
	agggaggtat	ccgttccggc	ggagatcctg	cggaggteca	ggaaattccc	tcgagcgtat	6240
	cccatatggg	cacgcccggg	ttacaacctc	ccactgttag	agtcctggaa	ggaocccggc	6300
	taagctccctc	cagtgtgaca	cgggtgtcca	ltgcgccttg	ccaaggcccc	tcagatacca	6360
	cctccacgga	ggaagaggac	gggtgtctct	tcagaatcta	cagtgctctc	tccttggcgc	6420
	gagctccgca	caaaagacct	oggcagctcc	gaatcgtcgg	cgttgcacag	cggcacggca	6480
	acggcctctc	ctgaccagcc	ctccagagac	ggcgagccgg	gatccgacgt	tgagtcgtac	6540
	tctccatgc	cccccttga	gggggagccg	ggggatcccg	atctcagcga	cgggtcttgg	6600
	tctacogtaa	gcgaggaggc	tagtgaggac	gtcgtctgct	gtctgalgtc	ctacacatgg	6660
	acaggcgccc	tgatccagcc	atgogctgcg	gaggaaacca	agctgcccac	caatgcactg	6720
	agcaactctt	tgctccgtca	ccacaacttg	gtctatgcta	caacatctcg	cagcgcaagc	6780
	ctcggcgaga	agaaggtcac	ccttgacaga	ctgcaggltc	tggaagacca	ctacccggac	6840
	gtgtccagg	agatgaaggc	gaaggcgtcc	acagtttaag	ctaaactctt	atccctggag	6900
	gaagcctgta	agctgacgac	ccacacattc	gccagatcta	aatttggcta	tggggcaaa	6960
	gacgtccgga	acatatacag	caaggccgtt	aaccacatcc	gctcgtgtgt	gaaggacttg	7020
	ctggaagaca	ctgagacacc	aattgacacc	accatcatgg	caaaaaatga	ggttttctgc	7080
	gtcccaacag	agaagggggg	cgcgaagcca	gctcgcttta	tcglatlcac	agatltgggg	7140
	gtcgtgtgtg	gcgagaaaa	ggccclliac	gatgtgtgtc	ccacccctcc	tcaggccgtg	7200
	attgggtctt	catacggatt	ccaaatactc	cctggacagc	gggtcagagt	cctgggtga	7260
	gcttggaag	cgaagaaatg	ccctatgggc	ttcgcalalg	acaccccgct	ttttgactca	7320
	acgggtcactg	agaatgacat	cgtgtgtgag	gagtcacatc	accaatgttg	tgaactggcc	7380
	cccgaaagcca	gacagggcat	aaggtcgctc	acagagcggc	tttaccatcg	gggccccltg	7440
	actaattctca	aagggcagau	ctgcggctat	cgcgggtgac	gcccagcgcg	tgtactgacg	7500

77				78			
accagctg	gtaataccct	cacatgttac	ttgaaggccg	ctgaggccctg	tcgagctg	7560	
aagctccagg	actgcaegat	gctcgtatgc	ggagacgacc	ttgtcgttat	ctgtgaaagc	7620	
gaggggaccc	aagaggacga	ggcgagccta	cgggccttca	cggaggctat	gactagatac	7680	
tctgcccccc	ctggggaccc	gcccaccca	gaatacgact	tggagttgat	aacatcatgc	7740	
tctcccaatg	tgtcagtcgc	gcacgatgca	tctggcaaaa	gggtgtacta	tctcaccctg	7800	
gacccccaca	cccccttgc	gcggtctg	tgggagacag	ctagacacac	tccagtcaat	7860	
tctggctag	gcaacatcat	catgtatg	cccaccttgt	gggcaaggat	gatccctgatg	7920	
actcatttct	tctccatcct	tctagctcag	gaacaacttg	aaaaagccct	agattgtcag	7980	
atctacggg	cctgttactc	cattgagcca	cttgacctac	ctcagatcat	tcaacgactc	8040	
catggccta	gogcattttc	actccatagt	tactctccag	gtgagatcaa	taggggtggct	8100	
tcattgctca	ggaaacttgg	ggtaccgccc	ttgcgagtct	ggagacatcg	ggccagaagt	8160	
gtccggccta	ggctactgtc	ccaggggggg	agggctgcca	cttgtggcaa	gtacctcttc	8220	
aaotgggcag	taaggaccaa	gctcaaaactc	actccaatcc	cggctgcgtc	ccagttggat	8280	
ttatccagct	ggttcgttgc	tggttacagc	gggggagaca	tatatcacag	cctgtctcgt	8340	
gcccgaaccc	gctggttcat	gtggtgccta	ctectacttt	ctgtaggggt	aggcatctat	8400	
ctactcccca	accgatgaac	ggggagctaa	acactccagg	ccaataggcc	atcctgtttt	8460	
tttccctttt	tttttttctt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttctcctttt	8520	
tttttctctt	ttttttcctt	ttctttcctt	tgggtgctcc	atcttagccc	tagtccaggg	8580	
tagctgtgaa	aggtccgtga	gccgcttgac	tgcagagagt	gctgatactg	gcctctctgc	8640	
agatcaagt						8649	

【0138】

【外19】

<210> 6
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 6

```

gccagccccc gattgggggg gacactecac catagatcac tccccgtgga ggaactactg 60
tcttcaagca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacogg gagtaacacg gaattgccag 180
gacgaccggg tcttttcttg gatcaaccog ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gacgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gctgatagg 300
gtgtcttgcga gtgccccggg aggtctctgta gaccgtgcac catgagcacg aatccataac 360
ctcaaaagaaa aaccaaaccg aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggggc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggaugagga ggcgggtat 600
cgtggctggc caccaggggc gttcccttgc cagctgtgct cgaacttctc actgaagcgg 660
gaaggggactg gctgctactg ggcgaagtgc cggggcaggga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat aoccttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccagcgga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaaagccg tcttgtcgat caggatgata tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcagag 900
cggaaatggt cgcaggctcc aaggcgcgca tgcgcgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcttactg ctgcttggcg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgtctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgtcttct ggtatcgccg 1140
ctcccgatttc gcagcgcatc gcttctctac gccttcttga cgaattcttc tgagttttaa 1200
cagaccacaa cggtttctct cttagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gcgaaagccg cttggaaataa ggcgggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttt 1380
acgagcattc ctagggtgtc ttccctctcc gccaaaggaa tgcgaaggtc gttgaatgtc 1440
gtgaaggaa gcttctctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacccct 1500
tgagggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaggcc ggcaacaacc cagtgcacag ttgtgagttg gatagtgtgt 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaacagga ttcaacagg ggtgaagga tgcacagaag 1680
gtacccattt gtatgggata tgatctgggg cctcgggtga catgttttac atgtgtttag 1740
tcgaaggtaa aaaaacttta ggcgcccgga accaggggga cgtgttttct ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattaacggc taactccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatcatac ctagctctac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagtg 1920
gtctccaccc caacacaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcgtgtg ttggactgtc 1980
tatcatgttg ccggtctaaa gaccttggcc ggcccaagg gcccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgttg accaggaccc cgtcggctgg caagcgcccc ccggggcgcg ttcccttgaa 2100
ccatgcacct ggcgcagctc ggacctttac ttgttcacga ggcattgccg tgtcattccg 2160
gtgcgcggcg ggggcgacag caggggggagc ctactctccc ccaggcccg ctcctacttg 2220
aagggtctct cggggcggtcc actgctctgc cctcgggggc atgtgtggg catcttctgg 2280
gctgcgctgt gcacccgagg ggttgcgaag gcggtggact ttgtacccg caggtctatg 2340
gaaaccacta tgcggtcccc ggtcttccac gacaaactgt cccctccggc cgtacccgag 2400
acattccagg tggcccatct acacggccct actggttagc gcaagagcac taagggtgag 2460
gctgcgcatg cagcccaagg gtataagggt cttgtctctg acccgctcgt cgcggccacc 2520
ctaggtcttc ggcggtatat gtctaaggca catggtatcg accctaact cagaaccggg 2580
gtagggacca tcaccacggg tgcgcccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttgc 2640
gacggtggtt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaact 2700
gactcgacca clatcctggg catcgggaca gtccctggac aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgtcg tgcctcgccc cgtacgacct ccgggacggg tcaccggtgc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcaactgga qaattccct tttatggcaa agccalccc 2880
atcgcgacca tcaagggggg gaggcacctc atttcttgc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctatc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
gatgtatccg tcataccnac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgtctaatg 3060
acgggcttta ccggcgattt cgaactcagc atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttca gctggacccc gacctcaac attgagacga cgaccggtcc acaagacgcg 3180
glqtaacgat ggcagcgggc aggcaggact ggtgggggca ggaaggccat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctggggcatg ttcgattcct cggctctgtg cgagtgtat 3300
gacgcgggct gtccttggtg cagctcagc ccgcgggaga cctcagtlag gttgcgggct 3360
tacctaaaca caccagggtc gccgtctgca caggaccatc tggagtcttg ggagagctc 3420
tttacaggcc tcaccacat agacgcccat ttcttgtccc agactaggca ggcaggagac 3480
aacttcccc acctgctagc ataccaggct acggtgtgcy ccagggtcca ggctccacct 3540

```

81	ccatcgtggg accaaatgtg ggagtggttc ataccgctaa agcctacgct gcacgggccc 3600
	acgcccctgc tgtataggct ggagcgcttc caaacagagg ttactaccac acaccccata 3660
	accaaataca tcatggcatg catgtcggtc gaactggagg tegtacagag caactgggtg 3720
	ctggtagggc gagtccatagc agctctggcc gcgtactgcc tgacaacagg cagcgtgggtc 3780
	attgtgggca ggatcatctt gtccggaaag ccggccatca ttcccgacag ggaagtccct 3840
	taccgggagt togatgagat ggaagag-gc gcttcacacc tcccttaacal cgaacaggga 3900
	atgcagctcg ccgaacaatt caaacagaag qcaatcggtt tgcctcaaac agccaccaag 3960
	caagcggagg ctgctgtctc cgtgggtgna tcaagtggc ggacctcga agcctcttg 4020
	gcgaagcata tgggaattt catcagcggg atacaatatt tagcaggctt gtccaatctg 4080
	cctggcaacc ccgcatagc atcaatgatg gaattcacag cctotatcac cagcccgctc 4140
	accacccaac ataccctcct gtttaacatc ctggggggat gggctggccg ccaactlgct 4200
	cctcccagcg ctgcttctgc ttctgtaggc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagg 4260
	ataggccttg ggaagggtgt tgtggatatt ttggcagggt atggagcagg ggttggcagg 4320
	gcgctcgttg cctttaagggt catgagcggc gagatgccct ccacagaggc cctggttaac 4380
	ctactccctg ctatccctc cctggcgcc ctagtctgct gggctgtgtg cgcacagata 4440
	ctgcgtcggc acgtgggccc aggggagggg gctgtgcagt ggtgaaccg gctgatacgc 4500
	ttcgtcttgc ggggttaacca cgtctccccc aggcactatg tglctgagag cgaagctgca 4560
	gcacgtgtca ctacgatcct ctctagtctt cccatcactc agctgctgaa gaggcttcac 4620
	cagtggatca acgaggactg gaactgttcc tctcccgcca tgcctcggct cgtggctaa 4680
	gattgcatc gcacgtgtgt gaactgttcc aagacotggc tcaagtccaa gctccctgac 4740
	cgtattcggc gagtccctct ctctctcatgt caacgtgggt acaaggaggc ctggcggggc 4800
	gacggcatca tgcaaaccc cctgccatgt ggagcacaga tcaacggaca tgtgaataac 4860
	ggttccatga ggtcgtggg gccatggacc tgtagttaaa cgttggcatg aacattcccc 4920
	atttaacgct acacacggg cccctgcacg cctcccccgg ccgcaaatca tcttagggcg 4980
	ctgtggcgta tggc-gctga ggagtaacgt gaggttacgc ggttggggga ttccactac 5040
	gtgacgggca tgacacactg caacgtaaag tgcctgtgtc aggttccggc ccccgaaatc 5100
	ttcacagaag tggatgggt cgggttgcc caggtaacgtc cagcgtgcaa accctccta 5160
	cgggaggagg tccatctct ggtygggtc aatcaatccc tggttgggtc acagctcccc 5220
	tggggggccc aaccggacgt agcagtgtct acttccatgc tccacgacct cctccacatt 5280
	acggcggaga cggctaagcg taggctggcc aggggatctc cccctcctt ggccagctca 5340
	tcagctagcc agctgtctgc gcttcccttg aaggcaaac gcaatacccg lcatgactcc 5400
	cgggacgctg acctcatcga ggccaacctc ctgtggcgcc agggatggg cgggaacatc 5460
	accccgctg agtcagaaaa taaggtagta attttggacc ctttcgagcc gctccaaagc 5520
	gaggaggatg agagggaagt atccgttccg gcggagatcc tgcggagggtc caggaaatcc 5580
	cctcagagca tgcacatctg ggccacgccc gattacaacc ctccactgtt agagtccctg 5640
	aaggaccggc actacgtccc cccagtgtgt caccgggtgt cattgccgcc tgccaaaggc 5700
	cctcagatca cactccacg gagggagagg acggttgtcc tgtcagaatc taccggtct 5760
	tctgccttgg cggagctcgc cacaagaaac ttccgcagcc ccgaatctgc ggcgctcgac 5820
	agcggcagcg caacggcctc tccctgaccag cccctccagc ccggcgagcg gggatccgac 5880
	gttagtctgt actcctccat gcccccctt gagggggagc ccgggggatcc cgtatccagc 5940
	gaocgggttt ggtctaccgt aagcagaggc gctagttagg acgtcgtctg ctgctcgatg 6000
	tcctacacat ggacaggcgc cctgatcacg ccatgcgctg ccggaggaaac caagctgccc 6060
	gtcaatgac tgagcaactc ttgtctccgt caccacaact tggctctatg tacaacatct 6120
	cgacgcgcaa gccctgggca gaagaaggct acctttgaca gactgcaggc cctggagcac 6180
	cactacaggc acgtgctcaa ggagatgaag gcgaaggcgt ccacagttaa ggctaaactt 6240
	ctatccgttg aggaagcctg taagctgaag cccccacatt ccggccagatc taaatttggc 6300
	tatggggcaa aggaagctcg qaacctatcc agcaaggccg ttaaccacat ccgctccgtg 6360
	tgggaaggat tgcctggaag cactgagaca ccaattgaca ccaccatcat ggcaaaaaat 6420
	gaggttttct gcgtcccaac agagaagggg ggcgcgaagc cagctcgcct tatcgtattc 6480
	ccagatttgg ggggtctgt gtgcgagaaa atggcccctt acgatgtggt ctccaccctc 6540
	cctcagggcg tgatgggctc ttccatacga ttccaatact ctcttggaac gcgggtcgag 6600
	ttctgtgtga atgcctggaa agcgaagaaa tgcctatggt gcttcgcata tgacacccgc 6660
	tgttttgact caacggtcac tgagaatgac atccgtgttg agggagtcac tatccaatgt 6720
	tgtgacttgg ccccccgaag cagacaggcc ataatgttgc tcaacagagc gctttacatc 6780
	ggggggcccc tgactaatlc taaagggcag aactgcggct atgcgggtg ccggcgagc 6840
	ggtgtactga cgaacagctg ccgtaatacc ctccatctgt atttgaaggc cgtgcgggcc 6900
	tgtcagctg cgaagctcca ggaactgacg atgctctgat gcggagacga ccttgcgtt 6960
	atctgtgaaa gcgcggggac ccaaggagac gaggcgagcc tacgggctt caccggagct 7020
	atgaactagt actcgtcccc ccttggggac ccgcccacac cagantccga cttggagttg 7080
	ataacatcat gctcctccaa tgtgicagtc gcgcacgatg catctggcaa aagggtgtac 7140
	tatctcacc gtgacccccc cacccccctt gcgcgggctg cgttggagac agctagacac 7200
	actccagtc attcctggct agccaacatc atcatgtatg cgcaccaact gtgggcaagg 7260
	atgatctga tgaactatct ctctccatc ctcttagctc aggaacaaact tgaaaaagcc 7320
	atgatctgic agaatccagc ggcctgttac tccattgagc cactlgaccl acctcagac 7380
	attcaacgac tccatggcct tagcgcattt tccctccata gttactctcc aggtgagac 7440
	aatagggtg cttcaatgcct caggaaactt ggggtaccgc ccttgcagat ctggagacat 7500

【0140】

cgggccagaa gtgtccgcg taggctactg tcccaggggg ggagggtctg cacttgtggc 7560
aagtacctct tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcaactccat cccggctcgc 7620
tcccagttgg atttatccag ctgggttaca gcgggggaga catatatcac 7680
agcctgtctc gtgcccagac ccgctgggtc atgtgggtgc tactcctact ttctgtaggg 7740
gtaggcatct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaatagg 7800
ccatcctgtt tttttccctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
tttttccctt ttttttccct atttttttcc tttttttccc ttttgggtgc ccatcttagc 7920
cctagtccag gctagctgtg aaaggctcgt gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
tgccctctct cgagatcaag t 8001

【0141】

【外22】

* * 【外21】

<210> 7
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

```

<400> 7
gccagcuccc gatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tccttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaaccggg gagtacaccg gaattgccag 180
gaagaccggg tcttttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgtc gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaagaaa aaccaaactg aacaccaacg gccgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ccttgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cagcaggggc gtteecttgc cagctgtgct cgaactgttc actgaaggcg 660
gaagggaactg gtctctattg ggcgaaagtc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgcga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gccgtctcat acgcttgatc 780
cggtacctg cccatttcgac caaccaagca aacatcgcat cgaagcagca cgtactcgga 840
tggaagcctg tcttgctgat caggatgata tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcagc 900
ccgaactgtt cgcagggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cagggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgcg aabatactgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcgcg gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatcc gcagcgcac gccctctatc gcttcttga cgaattcttc tgagttataa 1200
cagagccaaa cggtttccct cagcgggat caattccgcc cctctccttc cccccccct 1260
aacgttaactg gccgaagcgg cttggaataa ggccgggttg cgtttgtota tatgttattt 1320
tccaccatat tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctttg 1380
acgagcatcc ctagggtctc ttcccctctc gccaaaggaa tgcaggtctc gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagctctc tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgagggcagc ggaacccccc acctggcgag aggtgcctct gccgcacaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg ggcacacccc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtc aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag 1680
gtaccccatc gtatgggata tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tgagcgttaa aaaacgtcta gccccccga accacgggga cgtgtgtttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatgggcac gaatccctaaa cctcaagaa aaaccaaacc taacaccaac 1860
cgccgccccc aggaagtcac gtccccgggc ggtggtcaga tcgtcggttg agtttacctg 1920
ttgccgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgaagcggtg 1980
caacctcgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccagggg tagggccttg 2040
gctcagcccg ggtacccctg gccctctatc ggcaatgagg gcttgggggt ggcaggatgg 2100
ctcctgtcac cccgtggctc tgggctagt tggggcccca cggacccccc gcgtagttgg 2160
cgcaatttgg gtaaggtcat cgataccctc acgtgcggct tcgccgatct catggggtac 2220
attccgctcg tcggcgcccc cctagggggc gctgccaggg ccttggcgca tggcgctccg 2280
gttctggagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaaatctg ccggttctc cttttctatc 2340
ttccttttgg ctttgcgtgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaaccatgt caagaaacag tgctccaaag caagcattgt gtatgaggca 2460
gcggacatga tcatgcatac ccccggtgct gtgcccgtcg ttccggagaa caactcctcc 2520
cgctgctggg tagcgctcac tcccacgctc gcggccagga acgctagcgt ccccaactacg 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgctcgtt ggggcccgtg ctctctgctc cgtatgtac 2640
gtgggagata tctgcggatc tgttttctc gtcgcccagc tgttcaacct ctgcctcgc 2700
cggcacgaga cagtaacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacaggtcac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcacctacag cagcctagt ggtatcgag 2820
tactccggga tcccacaagg tgtcgtggat atgggtggcg gggccattg gggagctcta 2880
gcgggccttg cctaetattc catgggtggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
ctcttttgcg gcgttgacgg gggaaacctat gtgacagggg ggaagatggc caaaaacacc 3000
ctcgggatta cgtccctctt ttcaaccggg tcatccagga aaatccagct tgtaaaacac 3060
aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caacactggg 3120
ttccttgcgt cgctgttcta cgtgcacaag ttcaactcat ctggatggcc agagggcatg 3180
gccagctgca gcccacatga cgggttcgct cagggttggg ggccatcac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccttattgt tggcactacg cccccggcc gtgcggtatc 3300
qlaccgcggc cgcaggtgtg tggctcagtg tactgcttca ccccaagccc tgtcgtgggt 3360
gggacgaccg accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctta acaaacggcg gccgcgcaa ggcaactggg ttggctgtac atggalgaat 3480
agcaclqqgt tcaccaagac gtgcgggggc ccccctgta acatcggggg gatcggcaat 3540

```

85	aaaaccttga	cctgcccac	ggactgtctc	cgaagcacc	ccgagggcac	ltacaccaag	3600
	tgtgtgttcg	ggccttggtt	gacacccaga	tgttbggtcc	accacccata	caggcttttg	3650
	cactacccct	gcactgtcaa	ctttaccatc	ttcaaggtta	ggatgtacgt	ggggggagtg	3720
	gagcacaggg	togaagccgg	atgcaatttg	actcagggag	agcgttgtaa	cctggaggagc	3780
	aggcacagat	cagagcctag	cccgtgtctg	ctgtctacaa	cggagtggca	cgtatlgccc	3840
	tgttccctca	ccaccctaac	ggctctgtcc	actggtttga	tccatctcca	tcagaaagt	3900
	gtggagctac	aatacctgta	cggatatagg	tcggcggttg	tctcctttgc	aatacaatgg	3960
	gagtatgtcc	tgttgctctt	ccttcttctg	gcggacggcg	gcgtctgtgc	ctgcttgtgg	4020
	atgatgtctc	tgatagctca	agctgaggcc	gccctagaga	acctggtggg	cctcaacggc	4080
	gcacccgtgg	ccggggcgca	tggcattctc	tccttctctg	tgttcttctg	tgctgectgg	4140
	tacatcaagg	gcaggctggg	ccctggggcg	gcatatgccc	tctacggcgt	atggccgcta	4200
	ctcctgtctc	tgttggtgtr	accaccaaga	gcatacggca	tggacccggga	gatggcagca	4260
	tcgttcggag	gcgcggtttt	cgtagggtctg	atactcttga	ccttgtcacc	gcactataag	4320
	ctgttctctg	ctaggctcat	atggtgtgta	caatatttta	tccacagggc	cagggcacac	4380
	ttgcaagtgt	ggatccccc	cctcaacgtt	cggggggggc	gcgatgcctt	catcctcttc	4440
	acgtgcggga	tcaccccgga	gctaattctt	accatcacca	aaatcttggc	cgcatacttc	4500
	ggtccactca	tgggtctcca	ggctgggtata	accaaagtgc	cgtacttctg	gcgcgcacac	4560
	gggctcattc	gtgcattgat	gctgggtcgg	aaggttgcgt	ggggtcatta	tgctccaatg	4620
	gctctcatga	agttggccgc	actgacaggt	acgtacgttt	atgacatctt	caccccaactg	4680
	cgggactggg	cccacgcggg	cctacgagac	cttgcgggtg	cagttgagcc	cgtcgtcttc	4740
	tcgtataggg	agacccaagg	tatcacctgg	ggggcagaca	ccgcggcgty	tggggacatc	4800
	atctttggggc	tgcccgcttc	cgcccgccag	gggagggaga	tacatctggg	accggcagac	4860
	agccttgaag	ggcagggttg	gcgactcttc	gcgcctatta	cggcctaactc	ccaacagagc	4920
	cgaaggctac	ttggctgcat	catcactagc	ctcacaggcc	gggacaggaa	ccaggctcag	4980
	ggggagggtcc	aagtgtgttc	caccgcaaca	caatcttccc	tggcgacctg	cgtcaatggc	5040
	gtgtgttgga	ctgtctatca	tgtgtccggc	tcaaaagacc	ttgcggggcc	aaaggggcca	5100
	atcacccaaa	tgtaacccaa	tgtggaccag	gcctctctgc	gctggcaagc	gcccccggy	5160
	gcgcgttctc	tgacacccat	cacctgcggc	agctcggacc	tttacttggg	cacgaggcat	5220
	gcogagtgtca	ttccggtgcg	ccggcggggc	gacagcaggg	ggagcctact	ctccccagg	5280
	cccgctctct	acttgaaggg	ctcttcgggc	ggctccactgc	tctgcccctc	ggggcatgct	5340
	gtgtggcatct	ttcgggctgc	cgtlgtcaac	cgaagggttg	cgaaggcggt	ggaactttga	5400
	cccgctcaggt	ctatggaaac	cactatgcgg	tcccgggtct	tcacggacaa	ctcgtccctc	5460
	ccggccgtac	cgcagacatt	ccagggtggc	calctacacg	ccctactcgg	tagcggcaag	5520
	agcactaagg	tgccggctgc	gtatgcagcc	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaaccgc	5580
	tccgtgcggc	ccaccctagg	tttcggggcg	tatatgtcta	aggcacatgg	batcgacctt	5640
	aacatcagaa	ccggggtagg	gacatcaccc	acgggtgccc	ccatcacgta	ctccacctat	5700
	ggcaagtctc	ttgcgcagcg	tgggtgtctc	ggggggcgct	atgacatcat	aatatgtgat	5760
	gagtcggctc	caactgactc	gaccactatc	ctgggcctcg	gcacagtcct	ggaaccaagc	5820
	gagacggctc	gagcgcgact	cgtcgtgtct	gccaccgcta	cgcctccggg	atcggtaacc	5880
	gtgcacacac	caaacatcga	ggaggtggct	ctgtccagca	ctggagaaat	ccccctttat	5940
	ggcaaaagca	tccccatcgc	gaccatcaag	ggggggaggc	acctcatttt	ctgcatttcc	6000
	aagaagaaat	gtgatgagct	cgccgcgaag	ctatccggcc	tcggactcaa	tgctgtagca	6060
	tattacccgg	gccttgatgt	atccgtcata	ccaactagcg	gagaogtoat	tgctgtagca	6120
	acggacgtct	taatgacggg	ctttaccggc	gatttgcact	cagtgatcga	ctgcaatata	6180
	tgtgtccacc	agacagtcca	cttcagcccg	gacccgacct	tcaccattga	gacgacgacc	6240
	gtgcacaaag	acgcggtgtc	acgctcgcag	cggcgaggca	ggactggzag	gggcaggatg	6300
	ggcattttaca	ggtttgtgac	tcaggagaaa	cggccctcgg	gcattgttga	ttcctcgggt	6360
	ctgtgcgagt	gctatgacgc	gggtctgtct	tggtacgagc	tcacggccgc	cgagacctca	6420
	glttgggttg	gggtttacct	aaacacacca	gggtgtcccg	tctgccaggga	ccatctggag	6480
	ttcttgggaga	ggtcttttac	aggctcacc	cacatagacg	cccatctctt	gtcccgact	6540
	aggcaggcag	gagacaactt	cccctacctg	gtagcatacc	aggctacggt	gtgcgccagg	6600
	gctcaggctc	cacctccatc	gtgggaccaa	atgtgggagt	gtctcatacg	gctaaagcct	6660
	acgttgcacg	ggccaaacgc	cctgtctgat	aggctgggag	ccgttcaaaa	cgaaggttact	6720
	accacacacc	ccataaccaa	atcacatcgt	gcattgcattg	cggctgacct	ggaggctcgtc	6780
	acgagcacct	gggtgctggt	agggcgaglc	ctagcagctc	tggcccgcta	ttgcttgaca	6840
	acaggcgagc	tggctcatctg	ggcgaggatc	atcttgtctg	gaaagccggc	catcattccc	6900
	gacaggggaag	tcctttaccg	ggagtctgat	gagatggaa	agtgcccttc	acacctccct	6960
	tacatcgaa	agggaaatga	gctcgcgcaa	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgcgtg	7020
	caaaacagca	caaagcaagc	ggaggctgct	gctcccgtyg	tggaaatccaa	gtggcgggacc	7080
	ctcgaagcct	tctgggggaa	gcataatgtg	aatttcatca	gcgggatata	atattttagca	7140
	ggcctgtcca	ctctgcctgg	caaccccgcg	ataqcalcac	tgatggcatt	cacgcctctt	7200
	atcaccagcc	cgctcaccac	ccaaacatac	ctctctgtta	acatcctggg	gggatgggtg	7260
	gcccgcacac	ttgctcctcc	cagcgtctct	tctgttttcc	laagcgccgg	catcgctgga	7320
	gcccgtgttg	gcagcatagg	ccttggggaag	gtgcttctg	atattttggc	aggtlatgga	7380
	gcagggggtgg	caggcgcgct	cgtggccttt	aaggtcatga	gcggcgagat	gccttccccc	7440
	gaggacctgg	ttaacctact	ccttgcctatc	ctctccctcg	gcgcctagt	cgtcggggtc	7500

87

gtgtgagcag cgatactgag tgggacgtg gggccagggg agggggctgt gcagtggatg 7560
 aaccggctga tagcgttcgc ttccgggggt aaccacgtct cccccacgca ctatgtgtct 7620
 gagagcgacg ctgcagcacg tgtcactcag atcctctcta gtcttaccat cactcagctg 7680
 ctgaagagggc ttccaccagtg gatcaacgag gactgtctcca cgcctatgccc cggctcgttg 7740
 ctaagagatg tttgggattg gatatgcacg gtgttgactg atttcaagac ctggctccag 7800
 tccaaagctcc tgcgcgcatg gccgggagtc ccttctctct catgtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagttctggc ggggcgacgg catcatgcaa accacctgcc catgtggagc acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaacggttc catgaggatc gtggggccta ggacctgtag taacacgttg 7980
 catggaaecat tccccattaa cgcgtacacc acgggcccc ccaacgccc cccggcgcca 8040
 aattattcta gggcgctgtg ggggttggt gctgaggaqt acgtgagagt acgtgagagt taccggggtg 8100
 ggggatttcc actacgtgac gggcatgacc actgacaacg taaagtgcgc gtgtcaggtt 8160
 ccggcccccg aattcttcac agaagtggat ggggtgcgtt tgcaacaggt cgtccagcg 8220
 tgcaaaccccc tctacggga ggaggtcaca ttcttggtcg ggtcfaatca atacctggtt 8280
 ggggtcacagc tcccatggg gcccgaaacg gactgagcag tgtcactctc catgctcacc 8340
 gacccctccc acattacggc ggagacggct aagcgtaggg tggcagggg atctccccc 8400
 tctctggcca gctcatcagc tagccagctg tctgcgcctt ccttgaaggc aacatgcact 8460
 acccgctcatg actccccga cgtgacccc atcgaggcca acctcctgtg gcggcaggag 8520
 atggcgggga acatcacccg cgtggagtea gaaaataagg tagtaattct ggactcttcc 8580
 gagcgctccc aagcggagga ggaatgaggg gaagtatccg tcccgcgga gatcctgccc 8640
 aggtccagga aattccctcg agcgtgccc atatgggacg gcccgatta caacctcca 8700
 ctgttagagt cctggaaagg ccgggaactac gtcctctcag tggtaacagg gtgtccattg 8760
 ccgctgcca aggcctccc gatccacct ccacggaggg agaggacggg tgtcctgtca 8820
 gaatctacgg tgtctctgct cttggggag ctcgcccaca agacctctcg cagctccgaa 8880
 tctcggcccg tgacagcgg cccggcaacg gctctcctg accagccctc cgaacgacgg 8940
 gacgggggat ccgacgttga gtcgtactcc tccatgcccc cctttagagg ggagccgggg 9000
 gatcccgatc tcagcgaagg gtcttggtct acgttaaggc agggaggtag tgaggacgtc 9060
 gctctgctgt cgtgtccta cacatggaca ggcgcctcga tcaacgcatg cgtgaggag 9120
 gaaaccaagg tgcctgtcaa tgcactgagc aactctttgc tccgtcacca caacttggtc 9180
 tatgtctaca catctcgacg cgaagcctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactg 9240
 caggctctgg acgaccacta cgggacgtg ctcaaggaga tgaaggcgaa ggcgtccaca 9300
 gtttaaggcta aactttctat cgtggaggaa gcctgttaag tgacgcccc acattcggcc 9360
 agatctaaat ttggctatgg ggcacaaggc gtccggaacc tatccagcaa ggcggttaac 9420
 cacatccgct ccgtgtggaa ggaacttgct gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 9480
 atcatggcaa aaaatgaggt ttctctgctc caaccagaga agggggggcg caagccagct 9540
 gcatatgaca cccgtgtttt tgactcaacg cgtgtgtgcg agaaaaatgg cctttacgat 9600
 gtgtgtctcca ccttccctca ggcgtgatg ggtcttctat acggattcca ataactctct 9660
 ggaacagcgg lcgagltcct ggtgaatgcc tggaaagcga agaaatgccc tatgggcttc 9720
 gcatatgaca cccgtgtttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttgaggag 9780
 tcaatctacc aatgttgtga cttggcccc gaagccagac aggccataag gtcgctcaca 9840
 gagcggtctt acatcgggg cccctgact aattctaaag ggcagaactg cggctatccg 9900
 cgttgcggcg cgaaggtgtt actgacgacc agctgaggta ataocctcac atgttatttg 9960
 aaggccgtg cggcctgtog agctgcgaag ctccaggact gcacgatgtc cgtatgagg 10020
 gagacacttg tctgtatctg tgaagcggcg gggacccaag aggcagaggc gagcctacgg 10080
 gcttccagg aggcctatgac tagatactct gcccccctg gggacccgcc caaacagaa 10140
 taagacttgg agttgataac atcatgctcc tccaatgtgt cagtccgcca cgtatcatct 10200
 ggcacaaagg tgtactatct caccctgac cccaccacc ccttgcggc ggcgtgctgg 10260
 gagacagcta gacacactcc agtcaatccc tggctaggca acatcatcat gtatgcggcc 10320
 accctgtggg caaggatgat cctgatgact catttctct ccatcctct agctcaggaa 10380
 caacttgaaa aagccctaga ttgtcagatc taaggggcct gttactccat tgagcactt 10440
 gacctacctc agatcattca acgactccat ggcttagcg catttctact ccatagtta 10500
 tctccagggt agatcaatag ggtggttcca tgctcaggaa aacttgggg aaccgcccct 10560
 cgagtctgga gacatcgggc cagaagtgtc cgcgctaggc tactgtccca gggggggagg 10620
 gctgcacatt gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaaccaagt caaactcact 10680
 ccaatccggc ctgcgtccca gtttgattta tccagctggt tccgttctgg ttacagcggg 10740
 ggagacatat atcacagcct gtctcgtgcc cgaacccgct ggttcagtgt gtgcctactc 10800
 ctactttctg taggggtagg catctatcta ctcccaacc gatgaacggg gactaaaca 10860
 ctccaggcca ataggccatc ctgttttttt ccttttttt ttttctttt ttttctttt 10920
 tttttttttt tttttttt tctttttt tctttttt ttttctttt ttttctttt 10980
 tggctccact tttagccatg tcaaggtatg ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 11040
 agagagtgtc gatactggcc tctctgcaga teaagt 11076

88

<210> 8
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 8

```

gacaccccc gattggggggc gacaccccc catagatcac tccccctgtga ggaactactg 60
tclltacgca gaaagcgctct agccatggcg ttagtatgag tgttgtgcag cctccaggac 120
ccccccctccc gggagagacca tagtggtctg cggaaccggg gagtacaccg gaattggccag 180
gacgacgggg tctcttctctg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
ggagagactgc tagccgagta gtgttgggtc gogaaaggcc ttgtgtgtact gctgtatagg 300
gtgtcttgca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcagc aatcctaaac 360
ctcaaaagaaa aaccaaaccgt aacaccaacg ggccgcccac gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaaacaga 480
caatcgagctg ctctgatgce gccgtgttcc ggctgtcage gcaggggcgc cgggttcttt 540
tgttcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtgtgtgce oacgaagggc gttccttgog cagctgtgct cgaactgttc actgaagcgg 660
gaaggagactg gctgctattg ggccgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaacttg 720
ctctcgcgca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcac acgcttgatc 780
cggtaacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgaagcagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctcgcggcag 900
ccgaactgtt cgccaggctc aaggcggcga tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgacc 960
atggcgactgc ctgottgccc aatatactgg tggaaaatgg ccgctttctc ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggacccgt atcaggacat agcgtgggt acccggtgata 1080
ttgttgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgtcttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gacgcgcac cctctctatc gcttcttga cgaactcttc tgagttttaa 1200
cagaccacaa cgggttctct clagcgggat caattccgcc cctctcctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccgggttg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatata tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aactcggccc tgtcttcttg 1380
acgagcattc ctagggtct tccoctctc gccaaaggaa tgcgaagtct gttgaatgtc 1440
gtgaaggagc cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaacctt 1500
tagagcgacg ggaaccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg gcccaacccc cagtgcacg ttgtgagttg gatagtgtg 1620
gaaagagtc aatggctctc ctcaagcgt ttoaacagg ggtgaaggga tgcacagaag 1680
gtaccccat tgaatgggac gctcgggtgc otcgggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaagctta gggcccccga accacgggga cgtgttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattacggcc taotccaaac agaagcgagg cctacttgcc 1860
tgcatatca ctagcctcac aggcggggac aggaaccagg tccaggggga ggtccaagt 1920
gtctccacgg caacaaatc tttcctggcg acctgcctca atggcgtgtg ttggactgtc 1980
tatctagggt ccggtcaaa gaccttgc ggcacaaagg gccaatcac ocaaatgtac 2040
accaatgtgg accaggacct cgtcggctgg caagcggccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
ccatgcacct gcggcagctc ggaactttac ttgttcacga ggcattgcga tgtcattccg 2160
gtgcgcgggc ggggcgacag cagggggagc ctactctccc ccaggccgt ctctacttg 2220
aagggtcttt cgggcggctc actgctctgc cctcggggc acgctgtggg catctttcgg 2280
gctgccgtgt gcacccgagg ggttcggaag gcggtggact ttgtaccgt caggtctatg 2340
gaaacacata tgcgggtccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctcggcg cgtacogcag 2400
acattccagg tggcccatct acacgccct actggtagcg gcaagagcac taagggtccg 2460
gctgcgtatg cagcccaagg gtataaggty cltgtctga acctgtcgt gcgcgcacc 2520
ctaggttttg gggcgatat gtctaaaggca catggtatcg acctaaact cagaatcggg 2580
gtaaggacca tcaccaagg tgcacctatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttgcc 2640
gacggtggtt gctctggggg cgctatgac atcataatat gtyatgagtg ccaactcaact 2700
cactcgacca ctatcctgg catcggaaca gtccgtgacc aagcggagac ggtggagcg 2760
cgaactgtcg tgcctgccac cgctacggct ccgggatcgg tcaccggtgc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatcccc tttatggcaa agcatccac 2880
atcgagacca tcaagggggg gaggcacctc attttctgcc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
yatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcaltgtcg tagcaacgga cgtctaatg 3060
acgggtttta cgggtgactt cgaactcagt atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttea gcttggaacc gaacttcacc attgagagca cgaacgtgcc acaagacgg 3180
gtgtcacgtc cgcagggggg aggcaggact ggtaggggca ggalgggcat ttacaggtt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctggggcatg ttcgattcct cggttctgtg cagtgctat 3300
gacgggggtc gtgtttggtc cgaactcag ccgcgcgaga cctnarttag gttcggggct 3360
tacataaaac caccaggggt gccgctctgc caggacacac tggagttctg yagagggct 3420
ttacagggc tcaaccacat agacggccat ttcttctccc agactaagca ggcaggagac 3480
aacttccctt acctggtagc ataccaggct aagggtgtgg ccagggtaca ggtccacct 3540

```

91

ccatcgtggg accaaatgtg gaagtgtctc a laaggctaa agcctaagct gcaaggccca 3600
 accgcccctgc tgtatagggc gggagccggt caaaacaggg ttactaccac acaccccata 3660
 accaaataca tcatggcatg catgtcgggt gacctggagg tegtcaagag caactcgggtg 3720
 ctggtagggc gagtccctagc agctctggcc gcgtattggc tgacaaacagg cagcgtgggtc 3780
 attgtgggca ggtccatctt gtcgggaaag cgggccatca ttcccgacag ggaagtccctt 3840
 taocgggagt tcatgatgat ggaagagtgc gctccacacc tcccttacat cgaacaggga 3900
 atgcagctcg ccgaacaaat caaacagaaag gcaatcgggt tgcctgcaac agccaccaaag 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtggcggaa tccaagtggc ggaccatcga agcctctctg 4020
 gcgaagcata tgtggaattt catcagcggg atacaatatt tagcaggctt gtcacatctg 4080
 cctggcaacc ccgcgatagc atcacgatg gcattcacag cctctatcac cagcccgctc 4140
 accaccccaac ataccctcct gtttaacatc ctggggggat gggctggccg ccaacttgct 4200
 cctcccaagg ctgcttctgc tttcgtaggc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 ataggccctg ggaaggctgt ttggatatt ttggcagggt atggagcagg ggtggcaggc 4320
 ggcctcgttg cctttaaggc catgagcggg gagatgccct ccaacaggga cctggttaac 4380
 ctatcctctc cctcgccgc ctagtctcg ggtcgtgtg cgcagcgata 4440
 ctgcgtcggc acgtgggccc aggggagggg gccgtgcagt ggtgaaccg gctgatagcg 4500
 ttgccttcgc ggggttaacca cgtctccccc accactatg tgcctgagag cgaagctgca 4560
 gacgtgtca ctcagatcct ctctagtctt accatcact agctgctgaa gaggcttcac 4620
 cagtggatca acgaggactg gactgatttc aagacctggc cgtggctaag agatgttttg 4680
 gattggatgt gcaagctgtt gaacctggc tccagtcgaa gctcctgong 4740
 cgtatggcgg tagtccctct ctctcatgtl caacgtgggt acaaggaggt ctggcggggc 4800
 gaaggcatca tgcaaacacc ctgcacatgt ggggcacaga tcaacgggca tgtgaaaaa 4860
 gggtccatga ggtatgtggg gcttaggacc tglagtaaca cgtggatgg aacatccccc 4920
 attaaagcgt acaccacggg cccctgcacg cctcctcccg ccccaaatca tttcagggcg 4980
 ctgtggcggt tggctgctga ggaagtcgtg gaggttacgc ggtgggggga tttccactac 5040
 gtgacgggca tgaccactga cgcgttaag tgcctgtgtc aggttcgggc ccccgaaatc 5100
 ttcaacagaa tggatggggt ggggttcgac aggtacgccc cagcgtgcaa accctccta 5160
 cgggaggagg tccatctct ggtggggctc aatcaatacc tgggtgggta acagctccca 5220
 tgcgagcccg aaccgcatgt agcagtgctc acttccatgc tcaacgaccc ctccacattt 5280
 accgaggaga cggctaagcg taggclggcc aggggatctc ctccccctt ggccagctca 5340
 tcaagtagcc agctgtctgc gcttctcttg aaggcaacat gcaactacccg tcatgactcc 5400
 ccggaacgtg acctcatcga ggcacacctc ctgtggcggc aggatgtggc cgggaacatc 5460
 acccgctgg agtcagaaaa taaggtagta attttgact ctctcgagcc gctccaaagg 5520
 gaggagatg agagggaaat atccgttccg gccggagatcc tgcggagggtc caggaaatcc 5580
 cctcgagcga tgcctatatg ggcacgccc gattacaacc ctccactgtt agagtctgg 5640
 aaggaccccg actaagtcct tccagtggta caoggtgtgc cattgcggcc tgccaaggcc 5700
 cctccgatac cacttcaag gaggaaagg acggttgtcc tglcagaalc taccgtgtct 5760
 tctgctctgg cggagctcgc cacagagacc ttccgagct ccgaatcgtc ggcctcgac 5820
 agcggaagg caacgggctc tctgacacg ccctccgacg accggcagc gggtccogac 5880
 gttagctctg actcctccat gccccctt gagggggagc cgggggatcc cgtctcagc 5940
 gacgggtctt ggtctacgt aagcgaggag gctagttagg acgtcgtctg ctgctcgatg 6000
 tctacacat ggacaggcg cctgatcacg ccctgcctg cggagggaac caagctgccc 6060
 atcaatgac tgagcaactc tttgtcctg caocacaact tggctctatg tacaacatct 6120
 cgcagcgcaa gcctcgggca gaagaaggtc acctttgaca gactgcaggt cctggacgac 6180
 caactacggg acgtgtctaa ggaagtgaa gogaaggcgt ccacagttaa ggttaaacct 6240
 ctatccgtgg aggaagcctg taagctgacg ccccccacat cggccagatc taaatttggc 6300
 tatggggcaa aggaagctcg gaacctatcc agcaaggcgg ttaaccacat ccgtccgtg 6360
 tggaaaggact tgcgtggaaga cactgagaca ccaattgaca ccacatcat ggcaaaaaat 6420
 gaggttttct gcgtccaacc agagaagggg ggccgaagg cagctcgctc tatcgtaac 6480
 ccagatttgg gggttcgtgt gtcggagaaa atggcccttt agcatgtgtt ctccacccctc 6540
 cctcagggcg tcatggggctc ttcaataact ttcaataact ctctgggaca ggggtcgag 6600
 ttctcgttga atgcttgaa agcgaagaaa tgcctatagg gcttcgcata tgacacccgc 6660
 tgttttgnct caacggtcac tgagaatgac atccgtgttg aggagtcact ctacccatgt 6720
 tctgacttgg ccccggaagc cagacaggcc ataaggctgc tcacagagcg gctttacac 6780
 qggggccccc tgactaatc taaaggggcag aactgcggct atcgccgtg ccgcgcgagc 6840
 ggtgtactga cgacagctg cggtaatacc ctcaatgtt actgaaggc cgtgcggcc 6900
 tgtcgagctg cgaagctcca ggaactgac atgctctgat gcggagacga ccttgtcgtt 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaagaggac gaggcgagcc tacgggctt caggaggct 7020
 atgaactgat actctgccc ccctggggac ccgccaac cagaataaga cttggagtgt 7080
 alaaacatcat gctctccaa tglcaglc ygcacgalg catctgpcaa aagggtgtac 7140
 tatctacccc gtgacccac caccocctt gcgcgggctg cgtgggagac agctagacac 7200
 actocagtoa attcctggt aggcacate atcatgtat cgcocacott gtgggcaagg 7260
 atgatctga tgactcatct ctctccatc ctcttagctc aggaacact tgaanaagcc 7320
 ctgagttgtc agatctacg ggcctgttac tccattgagc cacttgacct acctcagac 7380
 attcaacgac tccatggct tagcgcatt tcactccata gttacccccc aggtgagac 7440
 aatagggtgg cttcatgct caggaaact ggggtaccg ccttgcgagt ctggagacat 7500

92

【0146】

* * 【外27】

cgggccagaa gtgtcggcg taggetacly tcccaggggg gaggggctgc cactgtggc 7560
 aagtacctct tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcaactcaat cccggctgcg 7620
 tcccagttgg atttatccag ctggttcgtt gctggttaca cggggggaga catatatcc 7680
 agcctgtctc gtgcccagac ccgctgggtt atgtgggtgc tactcctact ttctgtagg 7740
 gtaggcactc atctactccc caacccatga acggggagct aaacactcca ggccaatagg 7800
 coactcgtt tttttccct tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 7860
 tttttctct ttttttct cttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 7920
 cctagtcacg gctagctgtg aaaggtccgt gagccgctt actgcagaca gtgctgatac 7980
 tggcctctct ccagatcaag t 8001

【0147】

【外28】

93

<210> 9
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 9

```

gcaagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg tagtacacag gaattggcag 180
gacgacgggg tectttcttg gatcaacccg ctcaatgctt ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gctgatagg 300
gtgcttcgca gtgccccggg aggtctctga gacgtgacac catgagcaag aatcctaacc 360
ctcaaaagaa aacaaaacgt aacaccaaag ggcgcgcacat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgaactg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc ggcgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgaacctgtc ggtgcctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cagcagcggc gtctcttgcg cagctgtgct cagcgttgc actgaaggcg 660
gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaacttg 720
ctccctcgca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcgat accgttgatc 780
cggtctacct cccattcgac caaccaagca aacatcgcat cagagagaga cgtactcgga 840
tggagacggg tcttgtcgat caggtatgat tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcacag 900
cgaactgttt cgcaggtctc aaggcgcgca tgcgcgacgg caggatctc gtcgtgacct 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccggtttctt ggattcatcg 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggacggct atcaggacat acgcttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgtcttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gaagcgatc gcttctatc gcttcttga cagttcttct tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cgttttccct ctacgggat caattccgct cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggcgggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgcgtctttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctctg 1380
acgagcattc ctagggtgtt ttccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagtctctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
tgcaggcagc ggaacccccc acctggcgac agtgcctctt gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg ggcacaaacc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtc aatggctctc ctcaagcgtt tcaacaaggg gctgaaggga tgcacagaag 1680
gtacccattt gtatgggac tgcctgggg cctcgggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaagctta ggcacccgga accacgggga cgtgttttct ctttgaaaaa 1800
cacgataaata ccatgggcac gaatcctaaa cctcaaaaga aaaccaaag taacaccaac 1860
cgccgcccac aggaagtcac gttcccgggc ggtgttcaga tgcgtgggtg agtttacctg 1920
ttgcgcgcgc ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgaagcgtg 1980
caaccctcgt gaaggcgaca acctatccct aaggctcgcc agcccgaggg tagggccttg 2040
gctcagcccg ggtacccctg gccctcttat ggcattgagg gcttgggttg gccaggatgg 2100
ctcctgtcac cccgtggctc tccggctagt tggggcccca cggacccccg gcgtagggtg 2160
cgcaatttgg gtaaggctat cgtatccctc acgtggcggt tgcgcgatct oatgggttac 2220
atctcgtctg tgggcgcccc cctagggggc gctgcagggg cctggcgca tggcgctccg 2280
gttctggagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaaatctg ccggttgcct cttttctatc 2340
ttcctcttgg ctttgcgtgc ctgtttgacc atccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtacctgt caggaacgac tgcctcaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
gaggacatga lcatgcatac ccccggtgct gtgcccgtcg gcggccagga acgctagcgt ccccaactac 2520
cgctgctggg tagcgtctac tcccagctc ggcggccagga cgcgtagcgt ccccaactac 2580
acgatacagc gccatgtcga tttgctcgtt qgggcggctg ctctctgctc cgcctatgtac 2640
gtggagagac tctgcggatc tgttttctcc gtcgcccagc tgttcaacct ctgcctcgc 2700
cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacaggctac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcaactacag cagccctagt ggtatcgac 2820
tlaactcggg tcccacaagc tgtcgtggat atggtggcgg gggccattg gggagtccta 2880
gcgggcttgc cctactattc catggtgggg aactgggcta aggtctgat tgtgatgcta 2940
ctccttgcgc cgttgcgcg gggaaacctat gtcacagggg ggaagatggc caaaaaacac 3000
ctcgggatta cgtccctctt ttcaaccggg tcatccacga aaatccagct tgtaaacacc 3060
aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caaacctggg 3120
ttcctcgtcg cgtgttctca cgtgcacaag ttcaactcac ctggatgccc agagcgcatg 3180
gcaagctgca gcccatcga cgcgttcgct cagggtgggg ggcacacac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccttatgtt tggcactacg cccccggcc gtcggtatc 3300
gtaccgcggc cgcaggtgtg tggctcagtg tactgttcca ccccaagccc tgtcylggly 3360
qygaugacgc accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctta acaacacgcg gccgcgcgaa ggcactgggt ttggctgtac atggatgaat 3480
agcactgggt tcaccaagac gtgcgggggc ccccgctga acatcgggg gatcygcaat 3540

```

94

[0148]

[外29]

95

aaaaacottga ootgccccac ggactgcttc cggagaccac ccgaggccac ttacaccaag
 tgtgtgttcgg ggcccttggtt gacacccaga tgtttgtctc actacccata caggctttgg
 cactacccct gcactgtcaa ctttaccate ttaagqlta ggaatgaagt ggggggagtg
 gagcacagggc togaagccgc atgcaatttg actcagaggag agcgttgtaa cctggaggac
 agggacagat cagagcltag cccgctgctg ctgtctacaa cggagtggca ggtattgccc
 lgttccctta cccacctacc ggctctgtcc actggtttga tccatctcca ccagaacglo
 gltgaagtao aatacctgta cgggtatagg teggccgttg tctactttgc aatcaaatgg
 gagtattgtcc tgttgcctct ccttcttctg cgggacgggc gcgctctgtg ctgtttgtgg
 atgatgtctg tgatagctca agctgaggcc gccctagaga accctgggtgt cctcaacggc
 gcatccgtgg ccggggggca tggpattctc tcccttccctg tgttctctgt tgcctgctgg
 tacatcaagg gcaggctggg cccctggggcg gcatatgccc tctacggcgt atggccogta
 ctctctgtcc tgcctggcgtt accacccaga gcatagccca tggacccggg gatggcagca
 tccgtccggg gcgcggtttt cgtaggctct atactcttga ccttctcacc gcaataaag
 ctgttccctg ctaggctcat atgggtggtt caatatttta tccaccagggc cagaggcacac
 ttgcaagtgt ggaatcccccc cctcaacgtt cggggggggcc gcgaatggct catcctctcc
 accgtgcggga tccacccaga gctaactctt accatcacca aaatcttctg cgcataactc
 ggttcaactoa tgggtgctca ggctggtata accaaagtgc cgtactctgt gcgcgacac
 gggctcattg gtgcagcat gctgtgctgg aaggttctgt ggggtcatta tgtccaaatg
 gctctcatga agttggccgc actgacaggt acgtacgttt atgaccatct caooccatcg
 cgggactggg cccacggcgg cctacagagc cttgggggtg cagttgagcc cgtcgtcttc
 tctgataggg agaccaaagt tatcaacctg ggggcagaca ccgcggcgtg tggggacac
 atcttggggc tgcctgtctc cgcgcgaggg gggagggaga tacatctggg accggcagac
 agccttgaag ggcagggggt gcgaactctc gcgcctatta cggcctactc ccaacagacy
 cagggcctac ttggtgtcat catcactagc ctcacaggcc gggacaggaa ccaggctcag
 ggggaggtcc aagtggtctc caccgcaaca caatcttctc tggcgacctg cgtcaatggc
 gtgtgttggga ctgtctata tgggtccggc tcaaaagacc ttgcgggccc aaaggccca
 atcaccacaa tgtacaccaa tgtggaccag gacctcgtcg gctggcaagc gcccccggg
 ggcggttctc tgaacacatg caoctggggc agctcggacc tttacttggg cagaggccat
 gccgatgtca ttcggtgctg ccggcggggc gaacgagggg ggaagcctact ctcocccagg
 cccgtctctc acttgaagg ctcttcgggg ggtccactgc tctgcccctc ggggcacgct
 ttcgggcatct ttcgggctgc cgtg-gcacc cgaagggttg cgaaggcgtt ggaactttga
 ccggtcaggt ctatggaaac aactatgugy tccocgggtct tcaoggacaa ctgctccct
 ccggccgtac cgcagacat ccaggctggcc catctacacg cccctaactg tagcggcaag
 agcaactaag tgcgggtgc gtatgcagcc caagggtata aggtgcttgt cctgaacccg
 tccgttcggc ccaacctagg tttcggggcg tatatgtcta aggaacatgg tatggaocct
 aacatcagaa tgggggttag gaccatcacc aegggtgccc caatcacgta ctcacactat
 ggcaagtctc ttgcagacgg tgggttgcct gggggcgccct atgacatcat aatatgtgat
 gagtgcact cnaactgact gaccactatc ctgggcatcg gcaagytctt ggaaccaagc
 gagcggctg gagcgcgact cgtcgtgtgc gccacccgta cgcctccggg atcggtcaac
 gtgccacatc caaacatcga ggaaggtggc ctgtccagca ctggagaaat ccccttttat
 ggcaagacca tcccatcga gaccatcaag ggggggagcc acctcatctt ctgcaattcc
 aagaagaaat gtgatgact cgcgcggaag ctgtccggcc tccgactcaa tgcgttagca
 tattaccggg gcccttgatg atccgtcata ccaactagcg gagaagtcct tctcgttagca
 accgaacgtc taatgacggg ctttaccggg gacttcgact caagtatcga ctgcaatata
 tgtgtcacc cagacagtga cltcagcctg gaccgacact tcaacattga gacgacgacc
 gtgccacaag accgggtgtc accclcgag cggcgaggca ggactggtag ggcaggatg
 ggcatattaca ggtttgtgac tccaggagaa cggccctcgg gcatgttcca ttcctcgtt
 ctgtgcaggt gcatatagcc gggctgtgct tggtaacagc tcaagccccc egagaccta
 gtttaggttgc gggcttacct aaacacacca ggggttgccc tctgcccagg caatctggag
 ttctgggaga ggcctttac aggcclcacc cactatagac cccatttctt gtccagact
 aagcaggcag gagacaact cccclactct gtagcatacc aggctaaggt gtgcggcagg
 gctcaggctc caoctccatc gtgggaacaa atgtggaagt gtctcatag gctaaagcct
 accgtgcacg ggccaaacgc cctgctgtat aggtcgggag ccgttcaaaa cagagttact
 accacacacc ccataaccaa atacatcat gcatgcatgt cggctgacct ggaagtcgtc
 accagacact ggggtgctgt aggcggagtc ctgacagctc tggccgggtu ltccltgaca
 accaggcagc tggctcattgt gggcaggatc atcttgtccg gaaagccggc catcattccc
 gacagggaag tcccttaacg ggagttngat gagatggaag agtgccctc acacccctc
 tacatcgaac agggaaatgca gctcggcga caattcaac agaaggcaat cgggttgctg
 caaacagcca ccaagcaagc ggaaggtgct gctcccgtg tggaaatcaa gtggcgacc
 atcgaagcct tctggggcaa gcatatgtgg aatttcata gcgggataca atatttagca
 ggttctgcca ctctgcctgg caaccccgg atagcatcac tcatggcaat cacagectc
 atcaccagcc cgtcaccac ccaacatacc ctcctgttta acatcclgg gggalgggtg
 gcggcccaac ttgtctctcc cagcgtgct clclgctttc taggcggcg catcgttga
 gcggctgttg gcagcatag ccttgggaag qlgcttytg atattttggc aggtctatga
 gcagggttg caggccgcl cgtgggactt aaggtcatga cggcgagat gccctccac
 gaggactgg ttaacctact cctctctatc cctcctctg gcgcctagt cgtcgggtc

96

3600
 3660
 3720
 3780
 3840
 3900
 3960
 4020
 4080
 4140
 4200
 4260
 4320
 4380
 4440
 4500
 4560
 4620
 4680
 4740
 4800
 4860
 4920
 4980
 5040
 5100
 5160
 5220
 5280
 5340
 5400
 5460
 5520
 5580
 5640
 5700
 5760
 5820
 5880
 5940
 6000
 6060
 6120
 6180
 6240
 6300
 6360
 6420
 6480
 6540
 6600
 6660
 6720
 6780
 6840
 6900
 6960
 7020
 7080
 7140
 7200
 7260
 7320
 7380
 7440
 7500

97		98
gtgtgctgcag	cgatactgcg	tcggcagctg
aaocggctga	tagcgttcgc	ttcggcggtt
gagagcgacg	ctgcagcag	tgctcactcag
ctgaagaggg	ttcaccagtg	gatcaacgag
ctaagagatg	tttgggattg	gatatgcacg
tccaagctcc	lgcggcgatt	gcccgggagtc
ggagtctggc	ggggcgacgg	catcatgcac
ggacatgtga	aaaaocggtt	catgaggatc
catggaacat	tccccattaa	cggttacacc
aattatttcta	ggcgctgtg	gcgggtgggt
ggggattttcc	actacgtgac	gggcatgacc
ccggcccccc	aattctttcac	agaagtggat
tgcaaacccc	tctacggga	ggaggtcaca
gggtcacagc	tccccatgga	gcccgaaccc
gacccctccc	acattacggc	ggagacggct
cccttgccca	gctcatcagc	tagccagctg
acccgtcatg	actccccgga	cgctgacctc
atggggcgga	acatcacccg	cgctggagtca
gagccgctcc	aagcggagga	ggatgagagg
aggtccagga	aattcccccg	agcgtatgcc
ctgttagagt	ccgtggaagg	cccggaactac
ccgcctggca	agccccctcc	gataccacct
gaatctacgg	tgtcttctgc	cttgccggag
tcgttcggcgg	tcgacagcgg	caaggcaacg
gacggcggtg	ccgacgttga	gtctgtgtct
gatcccgatc	tcagcgacgg	gtctgtgtct
gtctgtctgt	cgatgtctca	cacatggaca
gaacaccaag	tgcccatcaa	tgcaactgag
tatgctacaa	catctcgag	cgcaagcctg
caggctccctg	acgacccacta	ccgggacgtg
gttaaggcta	aactttctat	cgctggaggaa
agatctaaat	ttggctatgg	ggcaaaaggac
ccatctccgt	ccgtgtggaa	ggacttgctg
atcatggcaa	aaaatgaggt	tttctcgctc
cgcccttatcg	tattccccga	tttgggggtt
gtggcttcca	ccctccctca	ggcgtgtatg
ggacagcggg	tcgagtttct	ggtgaatgcc
gcataatgaca	cccgctgttt	tgactcaacg
tcaatctaca	aattgttgtga	cttgcccccc
gagcggcttt	acatcggggg	ccccctgact
cggtgcggcg	cgagcgggtg	actgacgacc
aaggcccgctg	cgccctgtcg	agctgcgaag
gacgaccttg	tcgttatctg	tgaaagcgcg
gccctcacgg	aggctatgac	tagataactct
tacgacttg	agttgataac	atcaagctcc
ggcaaaaagg	tgtaactatct	cacccgtgac
gagacagcta	gacacactcc	agtcgaattcc
accttggtgg	caaggatgat	ccgtgatgact
caacttgaaa	aagccctaga	ttgtcagatc
gacctacctc	agatcattca	acgactccat
tctccagggtg	agatcaatag	ggtggcttca
cgagtctgga	gacatcgggc	cagaagtgtc
gctgccactt	gtggcaagta	ccctttcaac
ccaattccgg	ctgcgtccca	gttggtattta
ggagacatat	atcacagcct	gtctogtgcg
ctactttctg	taggggtagg	catctatcta
ctccaggcca	ataggccatc	ctgttttttt
tttttttttt	tttttttttt	tccttttttt
tggtctccat	ttagccctag	tcacggctag
agagagtgcct	gatactggcc	tctctgcaga
		tcaagt
		aggggggctg
		ccccccacgca
		gtcttaccat
		cgccatgtct
		atcttcaagac
		catgtcaacg
		catgtggggc
		ggacctgtag
		gcaacgcttc
		cccgccgcca
		tacggcggtg
		gtgtcagggt
		cgctccagcg
		atacttggtt
		catgctcacc
		atctctctcc
		aacatgcact
		gcggcaggag
		ggactctttc
		gatccctggc
		caacctcca
		gtgtccattg
		tgctctgtga
		cagctccgaa
		cgacgacggc
		ggagccgggg
		tgaggacgtc
		cgctgcggag
		caacttgctc
		tgacagactg
		ggcgtccaca
		acattcgcc
		ggccgttaac
		tgacaccacc
		caagccagct
		ccctttacgat
		atactctcct
		tatgggcttc
		tggtgaggag
		gtcgtccaca
		cggttatcgc
		atgttacttg
		cgatgcggga
		gagcctacgg
		caaaccagaa
		cgatgcactct
		ggctgogtgg
		gtatgcggcc
		agctcaggaa
		tgagccactt
		ccatagttac
		accgcccctg
		gggggggagg
		caaactcact
		ttacagoggg
		gtgcctactc
		gagctaaaca
		tttttttttt
		tttctcttgg
		gcttgactgc
		11076

<210> 10
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 10
 gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
 ccccoctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaecggg gagtacaccg gaattgccag 180
 gagcagccggg tcttttcttg galcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gcctgatagg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
 ctcaagaaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcggccat gattgaacaa gatggattgc 420
 acgcagggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
 caatcggtctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagg gcaggggggc ccggttcttt 540
 ttgtcaagac cgaactgtcc ggtgcctga atgaactgca ggaagaggca gcgcggctat 600
 cgtgctgtgg cagcaggggc gttccttggc cagctgtgct cgactgtgtc actgaagggg 660
 gaaggggact gctgctattg ggcaagtgcc cggggcaggga tctcctgtca tctcaacttg 720
 ctctcgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgtcat acgcttgatc 780
 cggctacctg cccattcgac caccagcgca aacatgcgat cgagcgagca cglactcgga 840
 tggagcgccg tcttgtcgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcag 900
 ccgaactgtt cgcagggctc aaggcgcgca tgcgcagcgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
 atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
 actgtggccg cctgggtgtg gcgagccgct atcaggacat agcgttggct acccggtgata 1080
 ttgttgaaga gcttggcgcc gaattgggtg accgcttctc cgtgtcttac ggtatcgccg 1140
 ctcccgatcc gcaagcgcat gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagttttaa 1200
 cagaccacaa eggtttcctc ctacgggat caattccgcc cctctccctc cccccccctc 1260
 aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccgggtgt cgtttctcta tatgttattt 1320
 tccaccatat tgcgtctttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
 acgacatttc ctacgggtct tccccctctc gccaaaaggaa tgcaagttct gttgaatgtc 1440
 gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt 1500
 tgcagggcagc ggaaccccc accctggcgac aggtgcctct gggccaaaa gccacgtcta 1560
 taagatacac ctgcacagcc gcacacacc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttctg 1620
 gaaagagtca aatggtctct ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgccacagaa 1680
 tgaccccatg gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
 tgcaggttaa aaaaagtcta ggcctccgga accacgggga cgtgggtttc ctttgaaaaa 1800
 cagcataata ccatggcgcc tattacggcc tactcccaac agcgcgagg cctacttggc 1860
 tgcactcaac ctgcctcac aggcgggagc aggaaccagg tcagggggga ggtccaaagt 1920
 gtctccaccg caacacaaac ttctctggcg acctgcgtca atggcgtgtg ttggactgtc 1980
 tatcatgttg ccggtcctaa gacccctgcc ggcccaagg gcccaatcac ccaaatgtat 2040
 accaatgttg accaggaact cgtcggtgtg caagcgcccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
 ccatgcacct gcggcagctc ggacctttac ttggtcacga ggcattgcga tgtcattccg 2160
 gtgogcgogo gggggagcag cagggggagc ctactctccc ccaggcccggt ctcctacttg 2220
 aagggctctt cggcggttcc actgctctgc cctcgggggc acgctgtggg catcttctcg 2280
 gctgcccgtg gcacccgagg ggttgogaag cgggtggact ttgtaccogl cgagtctatg 2340
 ggaaccacta tgcggttccc ggtcttcaag gacaactcgt cccctccggc cgtaccgcag 2400
 acattccagg tggccatct acacgcccc actggttagc gcaagagcac taagtgccc 2460
 gctgcgtatg caggccaaag gtataagggt cttgtcctga acccgtecgt cgcgcacac 2520
 ctagggttct gggcgatat gctaaaggca catggtatcg accctaactc cagaatcgcg 2580
 gtaagggaaca taaccaaggg tgcctccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttgc 2640
 gacgggtggt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaact 2700
 gactcgacca ctatcctggg catcgacaca gtcctggacc aagcggagac ggctggagcg 2760
 cgactcgtcg tgctcgccac cgttaacgct ccgggatcgg tcaccggtgc acatccaaa 2820
 accgaggagg tgctctgtc cagcaactgga gaaatccctc tttatggcaa agccatcccc 2880
 atcgagacca tcaagggggg gaggcacotc attttctgccc attccaagaa gaaatgtgat 2940
 gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
 gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgctctaatt 3060
 acgggcttta ccggcgactt cgactcagtg atcgactgca atacatgtgt caccacagca 3120
 gtgcacttca gctggaccc gacotttccc attgagacga cgacgclgac acaagacggc 3180
 gtgtcacgct cgcagcgccg aggcaggact ggtaggggca ggatggscat ttacagggtt 3240
 gtgactccag gagaacggcc ctggggcatg ttgatctcct cggttctgtg cgagtgtat 3300
 gacgcgggct gtgcttggta cgagclcaay cccgccgaga cctcagttag gttgcgggct 3360
 taactaaaca caccagggtt gccctctctc caggaccatc tggagttctg ggagagcgtc 3420
 tttacaggcc taaccacat agacgcccac ttcttgtccc agactaagca ggcaggagac 3480
 aacttccccct acctggtagc ataccaggct acggtgtgng ccagggtcna ggctccacct 3540

101

ccatcggtgg accaaatgtg gaagtgtctc atacggctaa agcctaagct gcacggggcca 3600
 acgcccctgc lgtataggtc gggagccgtt caaaacgagg ttactaccac acaccccata 3650
 accaaataca tcatggcatg catgtcggct gacotggagg tegtaccag cacttgggtg 3720
 ctggttagggc gagtccetage agctctggcc gngtatgtgc tgacaaacagg cagcgtgggtc 3780
 attgtggggca ggaatcatctt gtccggaaaag ccggccatca ttcccgacag ggaagtcctt 3840
 taccgggagt tcatgagat ggaagagtgcc gectcacacc tcccttaccat cgaacaggga 3900
 atgcagctcg ccgaacaatt caaacagaag gcaatcggtt tgcgtcaaac agccaccaag 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtgggtggaa tcaaagtggc ggaacatoga agccttctgg 4020
 gcgaagcata tgtggaattt catcagcggg atacaatatt tagcaggclt gtccactctg 4080
 cctggcaacc ccgcatagc atcactgatg gcattcacag cctctatcac cagcccgctc 4140
 accacccaac ataccctcct gtttaacatc ctggggggat ggggtggcgc ccaacttgc 4200
 cctccacagc ctgctctgc tttogtaggc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 atagcccttg ggaaggtgct tgtggatatt ttggcagggt atggagcagg ggtggcaggc 4320
 gcgctcgtgg cctttaaggc catgagcggc gaggttgccct ccacggaggga cctggttaac 4380
 ctactccctg ctactccttc cctcggcgcc ctagtctgct gggctcgttg cgcagcgata 4440
 ctgctgctgg acgtggggcc aggggagggg gctgtgcagt ggaagaaacg gctgatagcg 4500
 ttgctctcgc ggggttaacca cgtctccccc acgcactalg tgcttgagag cgaagctgca 4560
 gcacgagtc ctcagatcct ctctagtctt accatcactc agctgctgaa gaggcttacc 4620
 cagtgatca acgaggactg ctccacggca tgcctcgggt cgtggctaaq agatgttttg 4680
 gattggatat gcacgggtgtt gactgatttc aagacctggc tccagtccaa gctcctgccc 4740
 cgattgcccgg gagtccctct ctctctcatgt caacgtgggt acaagggagt ctggcggggc 4800
 gacggcatca tgcacacac ctgcccattgt ggagcagaga tcaocggaca tgtgaaaaa 4860
 ggttccatga ggaatcggtg gcctaggacc ttagtaaca cgtggcatgg aacatcccc 4920
 attaacggct acaccaagg ccctgcacg cctcccccgg cgcacaaat ta ttctaggggc 4980
 ctgtggcggg taggtgctga ggaagtacgt gaggttacgc ggggtgggga tttccactac 5040
 gtgcgggga tgaacctga caacgtaaag tgcctgtgct aggttccggc ccccgaaatc 5100
 ttccacaga tggatgggggt cgggttgcaac aggtacgctc cagcgtgcaa acccctccta 5160
 cgggaggagg tcaatctcc tggctgggctc aatcaatacc tggttgggtc acagctccca 5220
 tgcgagcttg aaccggatgt agcagtgcct acttccatgc tcaocgaccc ctocccactt 5280
 aocggcgaga cggctaagc taggctggcc aggggatctc ccccccctt ggcagctca 5340
 tcagctagcc agctgtctgc gccctccttg aaggcaacat gcactacccg tcatgactcc 5400
 ccggacgctg aocctcatga ggccaacctc ctgtggcggc aggagatggc cgggaacatc 5460
 acccgctgg agtcaaaaa taaggttagta attttggact cttttagagc gctccaaagc 5520
 gaggaggatg agaggggagt atccgttccg cgggagatcc tgcggaggfc caggaaatc 5580
 cctcgagcga tgcctatag ggcacggccg gattacaacc ctccactgtt agagtccgtg 5640
 aaggaccgg actacgtccc tccagtggta caccgggtgtc cattgccgcc tgcacaggcc 5700
 cctccgatcc caoctccag gagggaagg acggttgctc tgcagaatc taccgtgtct 5760
 tetgcttgg cggagctggc caacggcctc tccgtgagcc ttgggcagct ccgaatcgtc ggcgctcgac 5820
 agcggcagc gttttagtctt acctcccat aagcggagg gcccctctt gagggggagc cgggggagc 5880
 gcgggtctctt ggtctacgtt aagcggagg gccagtggg acgtcgtctg cgtcgtctg 5940
 tctacacat ggacagcgcc cctgatccag ccatgcgctg cggaggaaac ctgctcgatg 6000
 atcaatgcac tgaaccaact tttgctccgt caccacaact tggctctatgc caagctgccc 6060
 cgcagcgcaa acctgcggca gaagaaggct acccttgaca tggctctatgc cctggagac 6120
 caactacggg acgtgtctaa ggagatgaag cogaaggcgt cactgcagggt cctggagac 6180
 ctactcgtgg aggaagcctg taagctgacg ccccccacat ccacagttaa ggctaaact 6240
 tatggggcaa aggaagcctg gaacctatcc agcaaggccg cggccagatc taaatttggc 6300
 tggaaaggact tgcctggaaga cactgagaca ccaattgaca ttaaccacat cggctccgtg 6360
 gagggtttctt gcgtccaaac agagaagggg ggcgcgaagc ccaactcat ggcaaaaaat 6420
 ccagatttgg ggggttcgtg gtgcgagaaa atggcccttt cagctcgcct tatcgtattc 6480
 cctcaggcct tgcatacggg ttcatacggg tlcataact ctctggaca cggggtcgag 6540
 ttctctggta atgctggaa agcgaagaaa tgcctatgg gcttcgata tgaacccgc 6600
 tgtttttgac caacggtcac tgagaatgac atccgtgttg agggagcaat ctaccaatgt 6660
 tgtgacttgg cccccgaagc cagacaggcc ataaggtcgc tccacagagc gctttacac 6720
 gggggccccc tgaactatcc taaaggcgag aactgcggct atcccggtg ccgcgcgagc 6780
 ggtgtactga cgaccagctg cggtaatacc ctcacatgth acttgaaggc cgtcgggccc 6840
 tgtcagagctg cgaagctcca ggaactgacg atgctcgtat gcggagacga ccttgcctt 6900
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaagaggac gaggcgagcc caggggcctt cactggagct 6960
 atgactagat actctgccc cctlygggac cggcccaaac cagaatacga cttggagttg 7020
 ataacatcat gntccctcca tgtgtcagtc ggcacgaltg cabctggcaa aagggtgtac 7080
 tatctacccc gtgacccccc caaccccttt ggcggggctg cgtgggagac agctagacac 7140
 actccagtc aattcctggct aggcacacat atcatgtat cgcccaactt gttggcagg 7200
 atgactcclga lgaactatct ctctccatc cttctagctc aggaacaaet tgaanaagcc 7260
 ctgattgttc agatctacgg ggcctgttau tccattgagc cacttgacct acctcagac 7320
 attcaacgac tccatggcct tagcgatctt tcaactcata gttactctc aggtgagac 7380
 aatagggtgg cttctatgct caggaaactt ggggtacccg ccttgccagt ctggagacat 7440

102

40 【外33】

ccggccagaa gtgtccgcgc taggctactg tcccaggggg ggagggtgc cacttgtggc 7560
 aagtaacctt tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcaactcaat cccggtcgg 7620
 tcccagtttg atttatccag ctggttctgt gctggttaca cggggggaga catatatca 7680
 agcctgtctc gtgcccgacc ccgclgggtt atgtggggc tactcctact ttctgtagg 7740
 gtaggcatct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggcacaaag 7800
 ccatctgttt tttttccctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
 tttttctcct tttttttcct ctttttttcc ttttttttcc tttgggtggc ccatcltayc 7920
 cctagtacag gctagctgtg aaaggtccgt gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
 tggcctctct gcagatcaag t 8001

【0152】

【0153】

【外34】

103

<213> 11
 <211> 11075
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

104

<400> 11
 gccagccccc gattgggggc gacactccac calagatcac tccctgtga ggaactactg 60
 tcttcaacga gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tctgtgcag cctccaggac 120
 ccccccctcc gggagagcca tagtggctcg cggaaaccgg tagtacaccg gaattgccag 180
 gacgacccgg tcccttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gggaaaggcc ttgtggtaact gctgatagg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gacgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
 ctcaaaagaa aaccaaactg aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
 acgacgggtt tccggccgct tgggtggaga ggtatttcgg ctatgactgg gcaaaacaga 480
 caatcgctg ctctgalgcc gccgtgttcc ggtgttcagg gcaggggcgc ccggttcttt 540
 ttgtcaagac cgaacctgtc ggtgcctga atgaactgca ggcagggca gcgcggctat 600
 ogtggtggc caogaaggc gtctctggc cagctgtgct cgaactgtc actgaaggc 660
 gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cgggcaggga tctctgtca tctcaccttg 720
 cctctcgcca gaagtatcc atcatggctg atgcaatggc ggcgtgcac acgcttgatc 780
 cggclacctg cccattcgac caacaagcga aacatcgcat cgaagagca cgtactcgga 840
 tggaaagccg tcttctcgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag 900
 ccgaactgtt cgcacggctc aaggcgcga tgcgcaggc cgaagtctc gctgtgacc 960
 atggcgatgc ctgcttgcg aatcatatgg tggaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
 actgtggccg gctgggtgtg ggggacgct atcaggacat agcgtggct acccgtgata 1080
 ttgctgaaga gcttggcggt gaattggctg acgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
 ctcccgatcc cagcgcacac gccctctatc gccctcttga cgaactcttc tgaattttaa 1200
 cagaacacaa cggtttccct ctaggggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
 aacgttaacty gcgaagccg ctctggataa ggcgggtgtg cgttctgtca tatgttattt 1320
 tccaccatatt tgcgtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctttg 1380
 acgagcattc ctagggtgtc ttccctctc gccaaaggaa tgcgaaggtc gtlgaatgtc 1440
 gtgaagggaag cagttctctt ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacccct 1500
 tgcagggcagc ggaacccccc acctggcgac agtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
 taagatacac ctgcgaaggc ggcacacccc cagtgcacg ttgtgagttg gatagttgt 1620
 gaaagagtaa aatgctctc ctcaacgta ttcaacaagg gctgaaggga tgcacagaag 1680
 gtatcccatc gtatggggtc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
 tgcagggttaa aaaaactcta ggcaccccca accacgggga cgtggttttc ctttgaanaa 1800
 oagacaata ccatgggcac gaaatctaaa cctcaaggaa aaaccaaagc taacacaaac 1860
 cgcgcctcac aggaactcaa gttccggggc ggtggtcaga tctcggttg agttacctg 1920
 ttgcgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgaagcggtc 1980
 caaccctgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggctcgcc agcccgaggg tagggccttg 2040
 gctcagcccg ggtacccctg gccctcttat ggcgaatgag gcttgggggtg ggcaggatgg 2100
 cctctgtcac ccgctggctc tgggoolagt tggggcccca cggaccccg gcgtaggto 2160
 cgcaactttg gtaaggccat cgataccctc acgtgcggct tgcgcgact catgggtac 2220
 attccgctcg tcggcgcccc cctagggggc gctgccaggg ccttgccgca tggcgtcccg 2280
 gttctggagg acggcgtgaa ctatgcacaa ggggaatctg ccggttgcct cttttctatc 2340
 ttctctttgg ctltgtctgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcccaac 2400
 gtatcccgag tgtaccatgt caagaaacga tgtcccaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
 ggggacatga tcatgcatac ccccggtgct gtgcccgcg ttcgggagaa caactcctcc 2520
 cgtgtgtggg tagcgtccac tcnccagctc ggggcccagg acgctagcgt ccccaactacg 2580
 acgatacagc gccatgtcga ttgtctgtt tggggcggtg ctctctgtct cgtatgtac 2640
 gtgggagata tctgggatac tgttttctct gtgcgccagc tgttccactt ctgcctcgc 2700
 cggcacagga ctgcaattgc tcaatatatc cgggccacgt gacaggctac 2760
 cgtatgtgctt gggatatgat gatgaactgg tcaactacag cagccctagt gglatcgag 2820
 ttacacggga tcccaaaagc tgtgtggat atggtggcg gggccattg gggagtccta 2880
 gcgggctctt cctactattc catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
 ccttctggcg cgtttgaagg gggaaacctat gtgacagggg ggcagatggc caaaaacacc 3000
 ccgggattla cgtccctctt tteacccggg teatccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
 aaocggcagc ggcacatcaa caggactgoc ctgaactgca atgactccct caacactggg 3120
 ttccctgtct cgtgttctca cgtgcacaaq tcaactcat ctggtgccc agagcgcag 3180
 gccagctgca gccccatoga cgcgttcgct caggggtggy ggcacatcac ttacaatgag 3240
 tcacacagct cggaccagag gccctattgt tggcactacg ccccccgcc gtgcggtatc 3300
 gtaccccgcg ccaggtgtg tggctccagt tactgcttca ccccaagccc tgtcgtggtg 3360
 gggacagacc aocggttcgg cgtccctacg tacagtggg gggagaaatga gacggacgtg 3420
 ctgcltclla acaacacgcg gccgcggcaa ggcactggt ttggctgtac atggatgaat 3480
 agcactgggt taccacagac gtcggggggy ccccggtgta acatcggggg gatcggcaat 3540

【0154】

【外35】

105					106
aaacacattga	cctgccccac	ggactgcttc	cygaaagcacc	ccgagggccac	ttacaccaag
tggtggttcgg	ggccttggll	gacacccaga	tgcttgggtcc	actaccacata	caggctttgg
cactacccct	gcaatgtcaa	ctttaccatc	ttcaagggtta	ggatgtacgt	ggggggagtg
gagcaaggc	tcgaagccgc	atgcaattgg	actcgaggag	aycvtgttaa	cctggaggac
agggacagat	cagagcttag	cccgtctclg	ctgtctacaa	cgagtgga	ggtattgccc
tggttcctca	ccacccctac	ggctctgtcc	actggtttga	ccacctcca	tcagaaagtc
gtggacgtac	aatacctgta	cggtataggg	tcggcggttg	ctcctttgc	aatcaaatgg
gaglatgtcc	tggtgctctt	ccttctctcg	gcggaagggc	gcgtctylgc	ctgcttgg
atgatgtctc	tgatagctca	agctgagggc	gccttagaga	acgtggtgg	cctcaacggc
gcacccgtgg	ccggggcgca	tgccattctc	tccttctctg	tggtctctcg	tgctgctgg
taacatcaagg	gcaggtctgt	ccttggggcg	gcataatgccc	tcacagcgct	atggcgcta
ctcctgtctc	tgctggcggt	accacacaga	gcatacgcca	tggaacggga	gatggcgca
tcgtgaggag	gcgcgggttt	cgtaggtctg	atactcttga	ccttgtcacc	gcactataag
ctgttccctg	ctaggctcat	atggtggtta	caatatttta	tcacacgggc	cgaggccacac
ttggcaagtgt	ggatcccccc	cctcaacgtt	cgggggggcc	gcgatgcgt	cactcctctc
acgtgcgcgc	tcacccccga	gctaattctt	accatcaaca	aatottgt	cgcaatactc
gggtccactca	tggtgtcca	ggctgggtata	accaaagtgc	cglaacttgt	gcgcgcacac
gggtcctatc	gtgcatgcat	gctgggtgcgg	aaggttgctg	gggttcatta	tgctccaatg
gctcctcaga	agtttgccgc	actgacaggt	acgtacgttt	atgacctct	ccccccactg
cgggactggg	cccaacgggg	cctacgagac	cttgcgylgg	cagltgagcc	cgctgtcttc
tcgtatattg	agaccaaagt	tatcactctg	ggggcagaca	ccgcggtgct	tggggacatc
atcctggggc	tgcccgctct	cgcccgaggg	gggagggaga	tacatctggg	accggcagac
agcctlgaag	ggcaggggtg	gcgactcctc	gcgcctatta	cggcctactc	ccacagagcg
cgagggcctac	ttgggtgcat	cactcactagc	ctcacaggcc	gggacaggaa	ccagggtcgag
ggggagggtcc	aagtgtgtct	caccgcacaa	caatctttcc	tggcgacctg	cgtaaatggc
gtgtgtttgga	ctgtctatca	tggtgcccgc	tcacaaagccc	ttgcccggcc	aaaggggccc
atcacccaaa	tgtaacccaa	tggtgaccaa	gacctgtctg	gotggaaagc	gcccccgagg
gcgcgttctc	tgacacccatg	cacctgcggc	agctcgagcc	tttacttggt	cacgagggat
gcgcatgtca	ttccggtgcy	ccggcggggc	gacagcaggg	ggagcctaact	ctccccaggg
ccgctctcct	acttgaagg	ctcttcgggc	gggtccactgc	ctgcccctc	ggggcacgct
gtgggcatct	ttccgggtgc	cgtgtgcacc	cgaggggttg	cgagggcggt	ggactttgta
ccgctcgagt	ctatgggaac	caclatgcgg	tcoccggtct	tcacggacaa	ctcgtccctc
ccggccgtac	cgcagacatt	ccaggtggcc	cactctacacg	ccctactctg	tagcggcaag
agcactaaag	tgccgggtgc	gtatgcaggg	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaacccg
tcctgtcgcc	ccacccctag	tttcggggcg	tatatgtctc	aggcacatgg	tatcgacctc
aacatccagaa	tcgggggtag	gacctcacc	acgggtgccc	ccatcaagta	ctccacctat
aggaaggttc	tlgcccagcg	tggttgctct	ggggggcgct	atgacatcat	aatatgtgat
gagtgccact	caactgactc	gacctatctc	ctgggactcg	gcacagtcct	ggaccagagc
gagacggctc	gagcgcgact	cgtcgtgctc	gcacccgcta	cgccctcggg	atcggtcacc
gtgcccacac	caaacatcga	ggaggtggct	ctgtccagca	ctggagaaat	ccccctttat
ggcaaaagcca	tcacccatga	gacctcaag	ggggggaggc	acctcatttt	ctgccattcc
aagaagaaat	gtgatgagct	cgcgcggaag	ctgtccggcc	tcggactcaa	tgctgtagca
tattaccggg	gccttgatgt	atccgtcata	ccaaactagc	gagacgtcat	tgctgtagca
accggacgctc	taattgacggg	ctttaccggc	gacttgcact	cagtgtatga	ctgcaataca
tggtgcccac	agacagtcga	cttcagcctg	gacccgacct	tcacatttga	gacgacgacc
gtgcccacaag	acggggtgtc	accctcgca	cgccgaggca	ggactggtag	gggcaaggatg
ggca..llaca	ggtttggtag	tcacaggaga	cggccctcgg	gcattgttga	ttcctcggtt
ctgtgagagt	gctatgacgc	gggctgtgct	tggtacgagc	tcacggccgc	cgagacctca
ttctgggttgc	gggcttaact	aaacacacca	gggttgcccg	ctctgcccagga	ccatctggag
ttctgggttgc	gcgtctttac	aggcctcacc	cacatagacg	cccatlctct	gtccacagact
uagcaggccag	gagacaaact	ccctacctg	glagcatacc	aggctacggg	gtgcgcacag
gctcaggctc	cacctccatc	gtgggaccaa	atgtgggaagt	gtctcatacg	gtcaaaagct
acgctgacag	ggccaacgcc	cctgctgtat	aggctgggag	cggttcaaaa	cgagggttaet
accacacaccc	ccataaccaa	atcacatcat	gcattgcattg	cggctgacct	ggaggtctgtc
acgagcacct	gggtgctggt	aggcggagtc	ctagcagctc	tgcccgcgta	ttgcttgaca
acaggccagcg	tggtcattgt	ggcgaggatc	atcttgtctc	gaaagccggc	cactcattccc
gacagggaag	tcctttacgc	ggagttcgat	gagatgggaag	agtgcgcctc	acacctccct
tacatcgaa	agggatgca	gctcgcgcaa	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg
caaacagcca	ccagcgaagc	ggaggctgct	gctcccglyg	tggaatccaa	gtggcgagac
atcgagacat	tcctggcgaa	gcataatgtg	aatltcatca	gcgggatata	atatttaqca
ggcttgcctca	ctccgctctg	caaccccgcg	atagcatcac	tgatggcatt	cacagcctct
atcacacagcc	cgtcaccac	ccacacatacc	ctcctgttta	acatcctggg	gggatgggtg
gcggcccaac	ttgtcctctc	cagcgtgctc	ctgcttctcg	taggcgcggg	catcgcttga
gcgggtgttgg	gcagcatagg	ccttgggaag	gtgcttctgg	atattttggc	agggttatgga
gcagggggtgg	caggccgctc	cglygcttt	aaggtcatga	gcggcgagtt	gcctccacc
gaggacctgg	tlacccctact	ccttgcctac	ctctccctg	gcgcctagtt	cgctgggylc

107		108
ggtgtgcgcag	cgataactgcg	tgggcacgtg
aaocgggtcga	tacggttgcg	tttgcgggggt
gagagcgagc	clgcagcacg	agtcaactcag
ctgaagaggc	ttcaccagtg	gatcaacgag
ctaagagatg	tttgggattg	gatatgcacg
tccaagctcc	tgcgcgattt	ggcgggagtc
ggagtctlgc	ggggcgacgg	catcatgcaa
ggacatgtga	aaaacgggtt	catgaggatc
catggaaacat	tcccaaltta	cgcgtacacc
aattattctta	gggcgctgtg	ggcggtaggt
ggggattttcc	actacglgac	gggcatgacc
ccggccccccg	aattctttcac	agaagtggat
tgcaaacccg	ttctacggga	ggaggtcaca
gggtcacagc	tcccatgcga	gcctgaaccg
gacccctccc	acallacggc	ggagacggct
cccttgccca	gcacatcagc	tagccagctg
acocgtcatg	actcccgga	cgtgaccttc
atggggcgga	acatccccc	cgtggagtoa
gagccgctcc	aagcggaggga	ggatgagagg
aggtccaggga	aattccctcg	agcgatgccc
ctgttagagt	ccctggaaggga	cccggaactac
ccgcttgcca	agccctctcc	gataccacct
gaatctaccg	tgtctctctg	cttggcggag
tgcgtgcggc	tcgacagcgg	cacggcaacg
gacgcgggat	cgaagcttga	gtcgtactcc
gatcccgatc	tcagcgacgg	gtcttgggtc
gtctgtctgt	cgatgtctta	cacatggaca
gaaaccaagc	tgcccatcaa	tgcatcgagc
tatgclacaa	catctcgag	cgcacacctg
caggtctctgg	acgancacta	ccgggacgtg
gllaaggcta	aacttctatc	cgtggaggga
agatctaaat	ttggctatgg	ggcaaaaggac
cacatccgct	ccgtgtggaa	ggacttctgt
atcatggcaa	aaaatgaggt	tttctgcgtc
cgccttatcg	tattcccgga	tttgggggtt
gtgggtctcca	ccctccctca	ggcgtgatg
ggacagcggg	tcgagttcct	ggtgaatgcc
gcataatgaca	cccgctgttt	tgactcaacg
tcaatctacc	aatgltgtga	cttggccccc
gagcggcttt	acatcggggg	ccccctgact
cgggtgcggc	cgaagcgtgt	actgacgacc
aaggcccgctg	cggcctgtcg	agctgcgaag
gacgaccttg	tgcgttatctg	tgaaagcgcg
gccttaacgg	aggtcatgac	tagatactct
tacgaacttg	agllgalaac	atcatgtctc
ggcaaaaagg	tgtactatct	caccgctgac
gagacagcta	gacacaccc	agtcatttcc
accttggtgg	caaggatgal	cttgatgact
caacttgaaa	aagccclaga	ttgtcagatc
gacctaccct	agatcatcca	acgactccat
tctccaggtg	agatcaatag	ggtggcttca
cgagcttgga	gacatcgggc	cagaagtgtc
gctgccactl	gtggcaagta	actcttcaac
ccaattccgg	ctgcgtccca	gttggattta
ggagacatat	atcacagcct	gtctcgtgcc
ctactttctg	taggggtagg	catctatcta
ctccaggcca	ataggccatc	ctggtttttt
tttttttttt	tttttttttc	ttcttttttt
tggtcccatc	ttagccctag	tcaaggctag
agagagtgtc	gatactggcc	tctctgcaga
		tcaagt
		ggcccagggg
		agggggctgt
		gcagtggtatg
		7560
		ccccccagca
		ctatgtgcct
		7620
		gtcttaccat
		cactcagctg
		7680
		cgccatgctc
		cggtcgtgg
		7740
		atttcaagac
		ctggctccag
		7800
		catgtcaacg
		tgggtacaag
		7860
		catgtggagc
		acagatcacc
		7920
		ggacctgtag
		taacacgtgg
		7980
		gcacgcctc
		cccgccgcca
		8040
		acgtggagg
		tacgcgggtg
		8100
		taaagtgcct
		gtgtcaggtt
		8160
		tgcacaggta
		cgctccagcg
		8220
		ggctcaatca
		atacctgtgt
		8280
		tgctcacttc
		catgtctacc
		8340
		tggccagggg
		atctccccc
		8400
		ccctgaaggc
		aacatgcact
		8460
		acctcctgtg
		cgggcaggag
		8520
		tagtaatttt
		ggactctttc
		8580
		ttccggcgga
		gatccctgcg
		8640
		gcccggatta
		caaccctcca
		8700
		tggtaacagc
		gtgtccattg
		8760
		agaggacgg
		tgctcctgtc
		8820
		agaccttcgg
		cagctccgaa
		8880
		accagccctc
		cgaacgagcg
		8940
		cccttgaggg
		ggagccgggg
		9000
		aggaggttag
		tgaggacgtc
		9060
		tcacgccatg
		cgtcgcggag
		9120
		tcctgtacca
		caacttggtc
		9180
		aggtcacctt
		tgacagactg
		9240
		tgaagcgcaa
		ggcgtccaca
		9300
		tgacgcccc
		acattcggcc
		9360
		tatccagcaa
		ggcgtttaac
		9420
		agacaccaat
		tgacaccacc
		9480
		agggggggcc
		caagccagct
		9540
		agaaaaaggc
		cccttaacgt
		9600
		acggattcca
		atactctcct
		9660
		agaaatgcc
		tatgggcttc
		9720
		atgacatccg
		tgttgaggag
		9780
		aggccataag
		gtcgtccaca
		9840
		ggcagaactg
		cggctatcgc
		9900
		ataccctcac
		atgttaactg
		9960
		gcacgatgct
		cgtatgcgga
		10020
		aggacgaggg
		gagcctacgg
		10080
		gggaaccgcc
		caaacccaga
		10140
		cagtcgcgca
		cgatgcactc
		10200
		cccttgccgg
		ggctgcgtgg
		10260
		acatcatcat
		gtatgcggcc
		10320
		ccatccctct
		agctcaggaa
		10380
		gttactccat
		tgagccactt
		10440
		catcttcact
		ccatagttac
		10500
		aacttggggt
		accgcccctg
		10560
		tactgtccca
		gggggggagg
		10620
		ggaccaagct
		caaaactcact
		10680
		tcgttgctgg
		ttacagcggg
		10740
		ggttcatgtg
		gtgcctactc
		10800
		gatgaaagg
		gagctaaaca
		10860
		ttttcttttt
		ttttcttttt
		10920
		tttctctttt
		tttctctttt
		10980
		ctgtgaaagg
		tcngtgagcc
		gcttgactgc
		11040
		11076

【図面の簡単な説明】

【図1】Aは本発明によるHCV-RNA構築物の構造を示している。Bはトランスフェクションして継代培養されたHu h-7細胞クローンにおける複製されたプラス鎖RNAの検出のための変性ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動の結果を示している。Cは選択された大部分の細胞クローンにおいて導入されたレプリコンDNAが存在しないことを証明するための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果を示している。

【図2】AはHCV-RNA構築物を有する細胞クローン(9-13)における導入されたレプリコンDNA

40 (プラスミド分子I₃₇₇ / NS 3-3' / wt) の高感度の排除のための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果を示している。BはHCVのプラス鎖RNAおよびマイナス鎖RNAの定量的ためのノーザンブロット試験の結果を示している。CはHCV-RNA複製のダクチノマイシンに対する耐性を証明するための細胞内で複製されたHCV-RNAの放射性標識後のホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動の結果を示している。

50 【図3】Aは代謝放射性標識後の免疫沈降による選択された細胞クローンにおけるHCV特異抗原の検出を示し

ている。BはHCV抗原の細胞内での所在の検出のための免疫蛍光試験の結果を示している。

【図4】図4は5' HCV-IRES、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (Neo^R)、異種の完全なHCV読み枠および確実な3' NTRからなる、本発明による選択可能なHCV-RNA構築物 (完全なゲノム) の構造の略図である。

【図5】図5はポリタンパク質をコードするヌクレオチド配列内に挿入された抗生物質耐性遺伝子 (単シストロン性RNA) (A) および3' NTR内に挿入された抗生物質耐性遺伝子 (2シストロン性RNA) (B) を有するHCV-RNA構築物の構造の略図である。

【図6】図6はNS3からNS5BまでのHCVレプリコンの一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造 (A)、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子からなる融合遺伝子の一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造 (B)、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子からなるレプリコンの一部として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造 (C)、自体の内部のリボソーム結合部位 (IRES) から発現される独立の遺伝子として挿入されたリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造 (D) の略図である。

【図7】図7は耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-RNA配列と結合しているHCV-RNA構築物の構造の略図である。

【図8】図8は耐性遺伝子および導入された外来遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造の略図である。

【図9】図9は全RNAとインビトロ転写物との比感染力の比較のための方法プロセスを示している。

* 30

* 【図10】図10は9-13クローンの配列分析を示している。

【図11】Aはリポーター遺伝子の使用による複製アッセイの原理を示している。Bは親HCV-RNA構築物 I₃₈₉ / Luc / NS3-3' / wt (wt) または以下の変異体: 不活性RNA (318DN)、変異体9-13Fもしくは変異体5. 1でトランスフェクションした細胞におけるルシフェラーゼ活性の比較を示している。

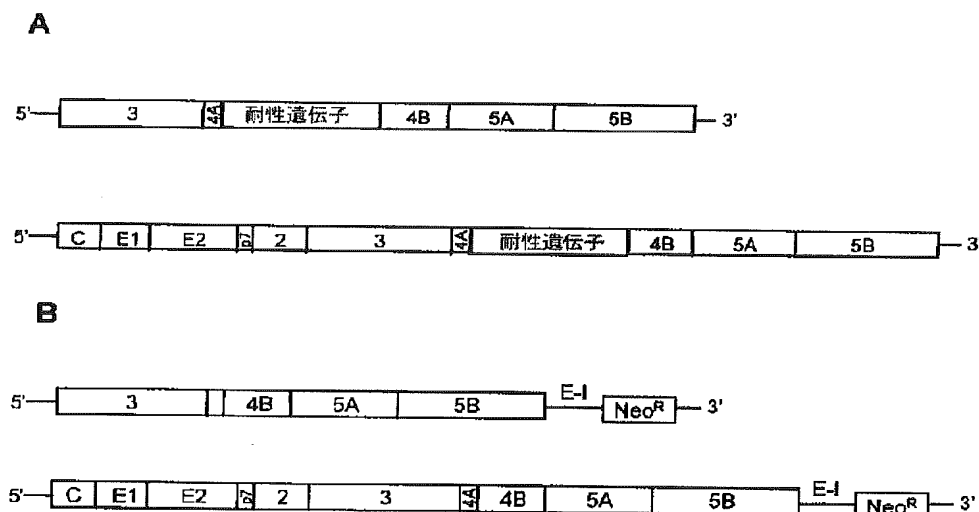
【図12】図12は選択可能なHCV全長ゲノム (構築物 I₃₈₉ / core-3' / 5. 1および I₃₈₉ / core-3' / 9-13F) を示しており、Aは全長構築物の略図であり、BはAに示される構築物 I₃₈₉ / core-3' / 5. 1のインビトロ転写されたRNA各0. 1 μgでHUH7細胞にトランスフェクションした後に得られるコロニーの数を示しており、Cは相応のインビトロ転写物のトランスフェクション後に得られるG418耐性細胞クローンにおける自律的に複製されるHCV全長RNAの検出を示している。

【図13】図13は1つのリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物を示しており、Aは2シストロン性HCV-RNA構築物を示し、Bは単シストロン性HCV-RNA構築物を示している。

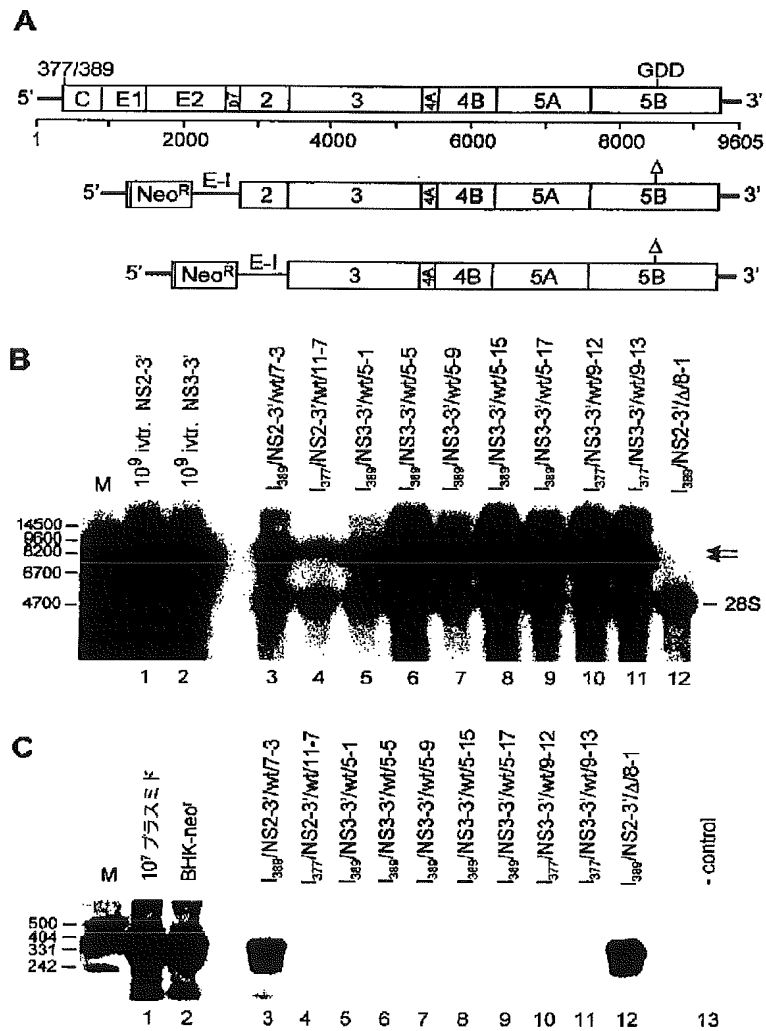
【図14】図14は耐性遺伝子に付加的に、挿入された外来遺伝子を有している3シストロン性のHCV全長RNA構築物を示している。

【図15】図15は耐性遺伝子がHCV成分を有する融合タンパク質として発現する単シストロン性HCV-RNA構築物を示している。

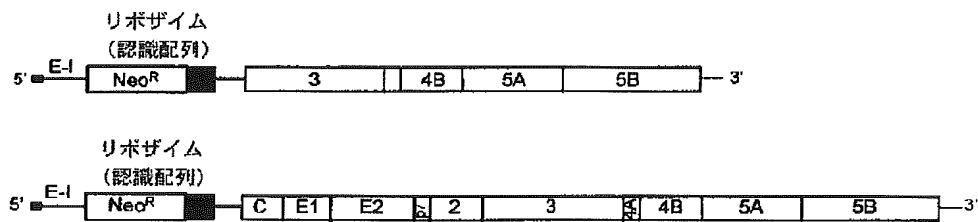
【図4】



【図 1】



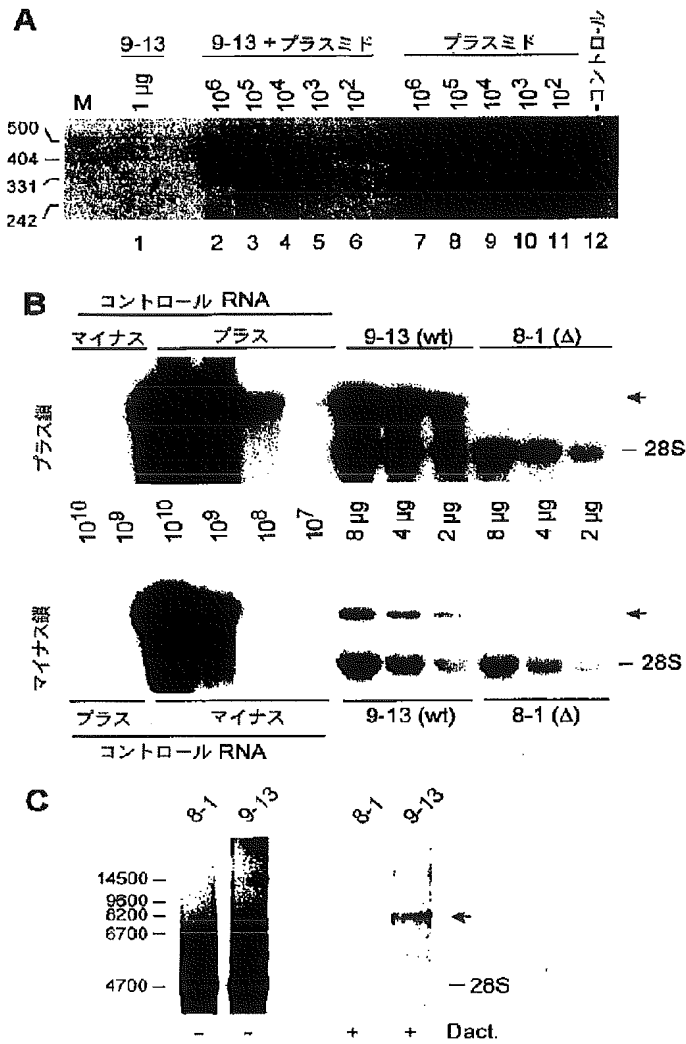
【図 7】



【図 8】



【図 2】



A

IP	9-13 (wt)	8-1 (Δ)	Transf.
3	5B	5B	5B
5B	5A	5A	5A
5A	3/4	3/4	3/4
4B	5B	5B	5B
5B	5A	5A	5A
5A	3/4	3/4	3/4
4A	5B	5B	5B
5B	5A	5A	5A
5A	3/4	3/4	3/4

9-13 (wt) 8-1 (Δ) Transf.

3 5B 5A 4B 5B 5A 4A

1 2 3 4 5 6 7 8 9

69 43 29 19 6,4

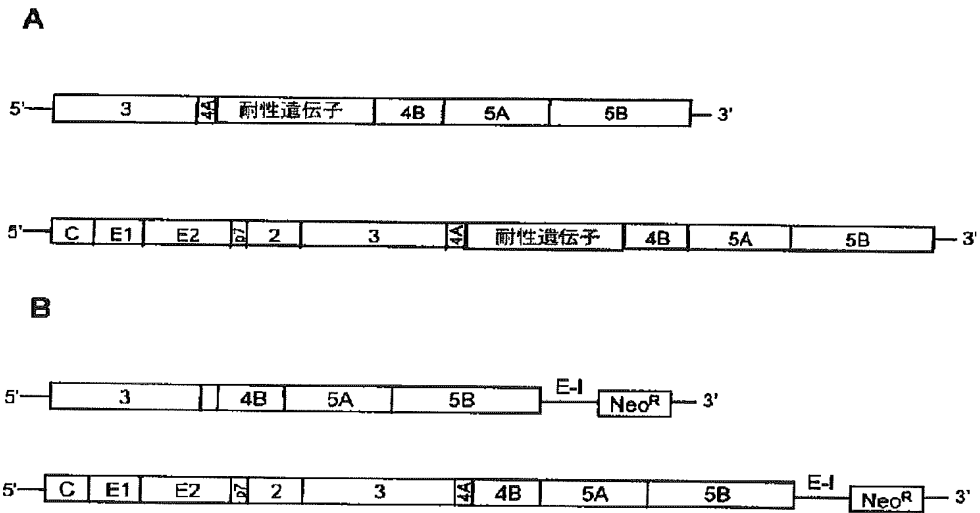
B

8-1 (Δ)	9-13 (wt)
NS3	NS5A

8-1 (Δ) 9-13 (wt)

NS3 NS5A

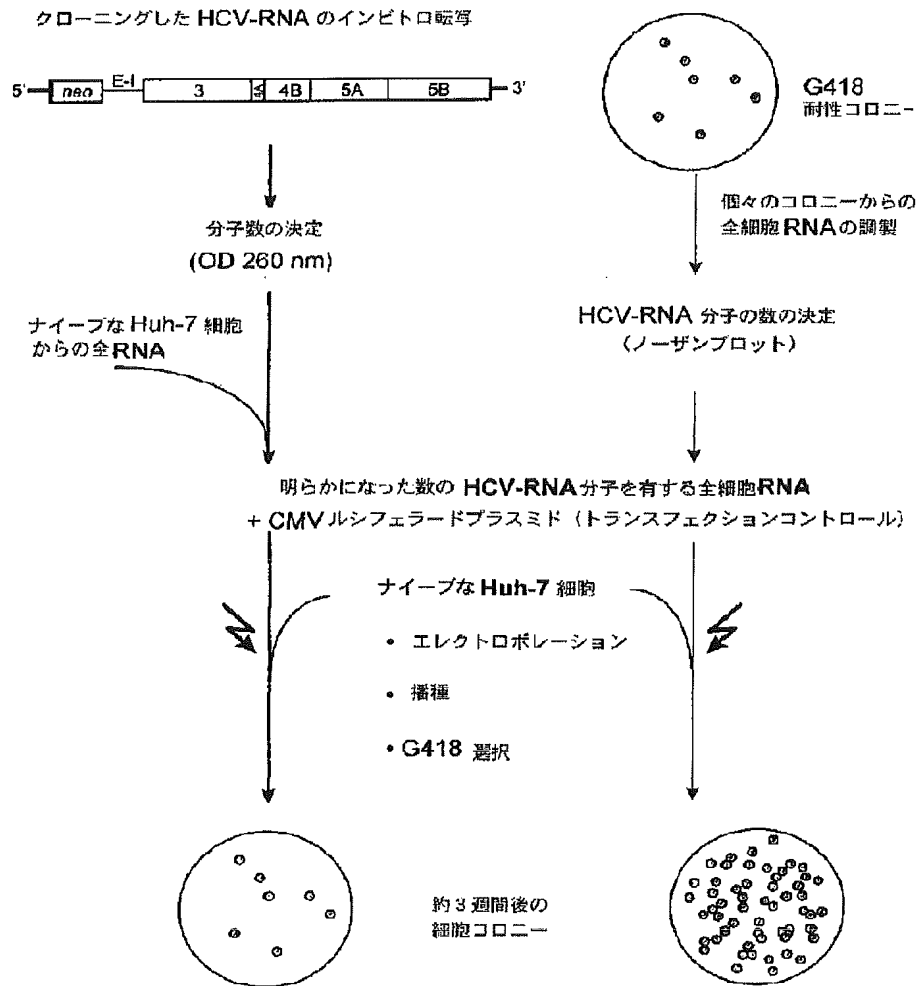
【図5】



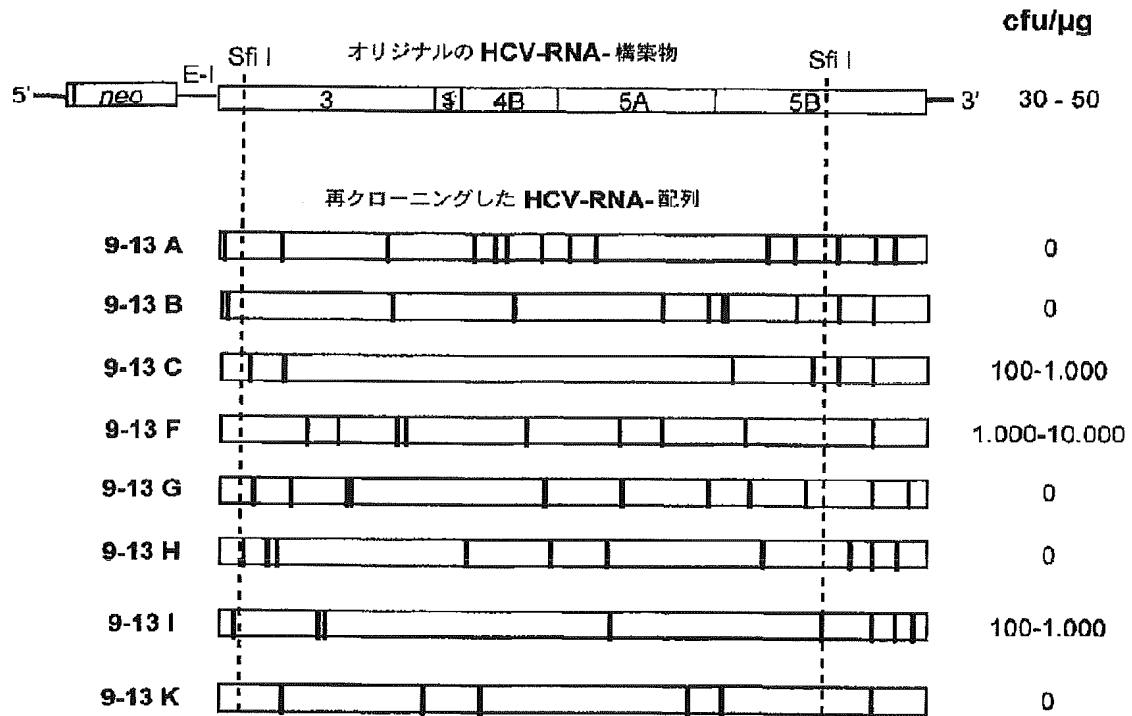
【図6】



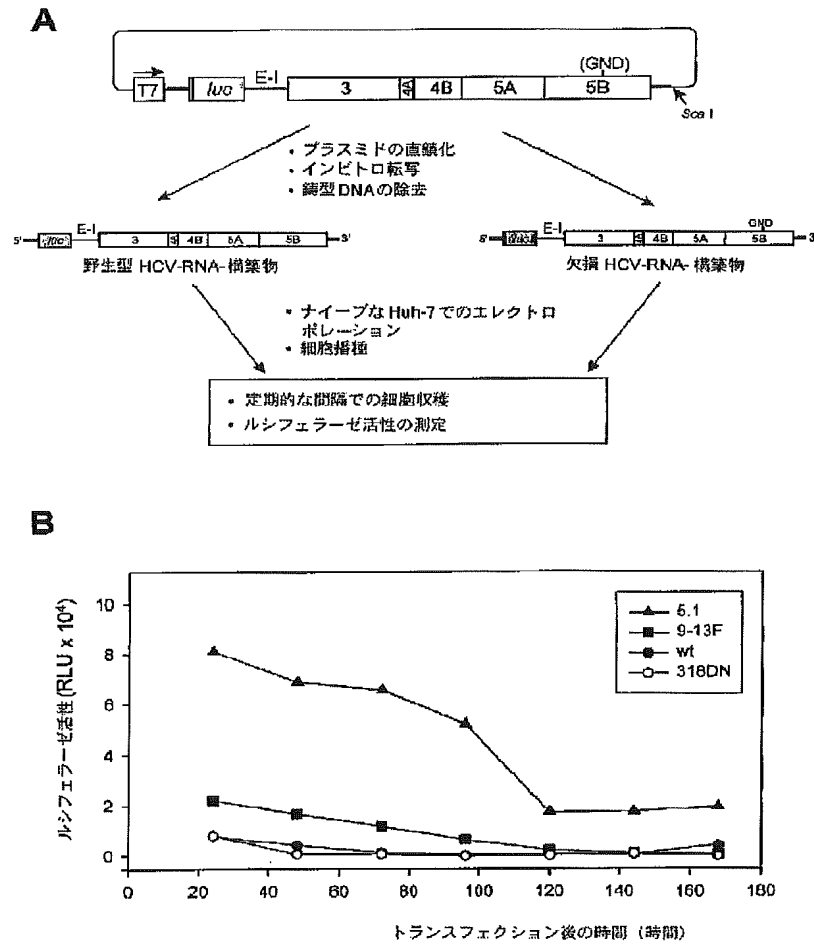
【図9】



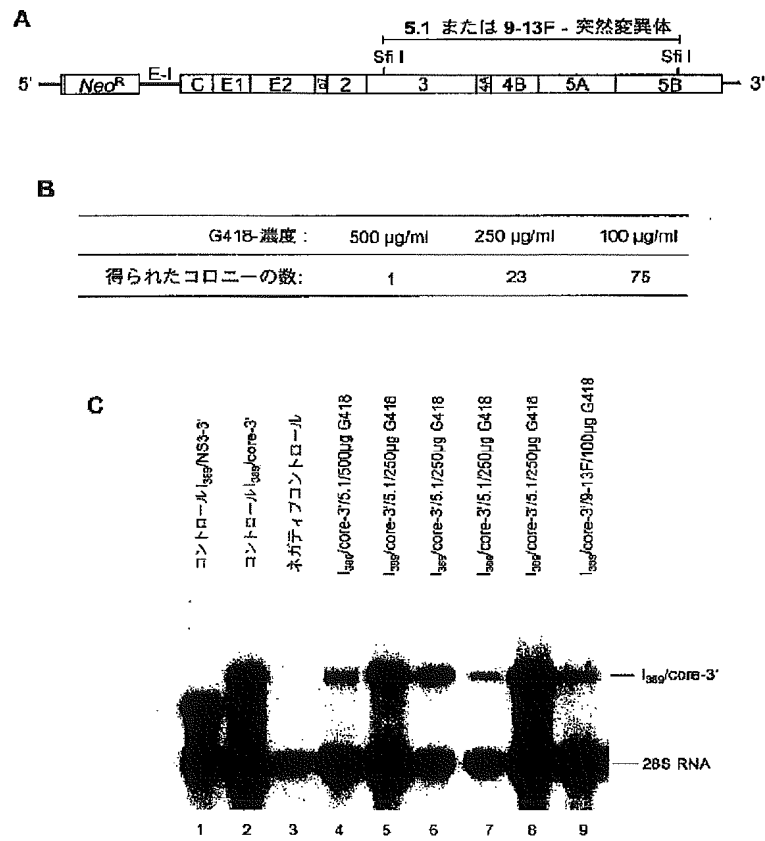
【図 10】



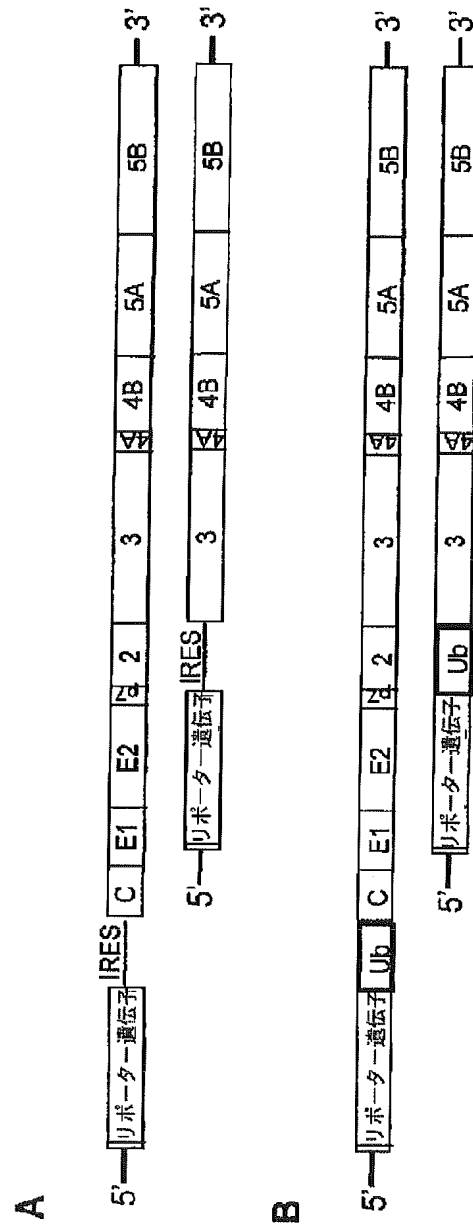
【図11】



【図12】



【図13】



【図14】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA33 CA04 CA11 DA02
EA04 GA12 HA01
4B065 AA90X AA96Y AB01 BA03
CA24 CA44 CA45

- (54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルス細胞培養系、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物、細胞培養系または構築物の使用、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得する方法、C型肝炎ウイルス-全長ゲノム、C型肝炎ウイルス-部分ゲノム、または任意のC型肝炎ウイルス-構築物の突然変異体の製法、細胞培養に適合したC型肝炎ウイルス-構築物、その突然変異体、C型肝炎ウイルス-全長ゲノムの突然変異体、C型肝炎ウイルス粒子またはウイルス様粒子、およびこれで感染した細胞